

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 355**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008 E 12170052 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2535354**

54 Título: **Anticuerpos para el receptor humano de muerte programada PD-1**

30 Prioridad:

18.06.2007 US 944583 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.06.2017

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME B.V. (100.0%)
Waarderweg 39
2031 BN Haarlem , NL**

72 Inventor/es:

**CARVEN, GREGORY JOHN;
VAN EENENNAAM, HANS y
DULOS, GRADUS JOHANNES**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 616 355 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos para el receptor humano de muerte programada PD-1

5 **Antecedentes de la invención**

El receptor de muerte programada 1 (PD-1) es un receptor inmunoinhibidor que se expresa principalmente en linfocitos T y B activados. Se ha demostrado que la interacción con sus ligandos atenúa las respuestas de linfocitos T tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha demostrado que el bloqueo de la interacción entre PD-1 y uno de sus ligandos, PD-L1, potencia la inmunidad de linfocitos T CD8⁺ específica de tumores y puede, por tanto, ser útil en la eliminación de células tumorales por medio del sistema inmunitario.

PD-1 (codificado por el gen *Pdcd1*) es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas relacionado con CD28, y CTLA-4. Se ha demostrado que PD-1 regula negativamente la señalización del receptor de antígeno tras el enlazamiento de sus ligandos (PD-L1 y/o PD-L2). Se ha resuelto la estructura de PD-1 murino así como también la estructura de co-cristal de PD-1 de ratón con PD-L1 humano (Zhang, X. et al., *Immunity* 20:337-347 (2004); Lin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:3011-6 (2008)). PD-1 y los miembros de la familia similares son glucoproteínas de transmembrana de tipo I que contienen un dominio de tipo Ig variable (tipo V) responsable de la unión de ligandos y una cola citoplasmática que es responsable de la unión de moléculas de señalización. La cola citoplasmática de PD-1 contiene dos motivos de señalización a base de tirosina, un ITIM (motivo de inhibición a base de tirosina de inmunoreceptor) y un ITSM (motivo de interruptor a base de tirosina de inmunoreceptor).

Tras la estimulación de los linfocitos T, PD-1 recluta la tirosina fosfatasa SHP-2 al motivo ITSM dentro de su cola citoplasmática, conduciendo a la desfosforilación de las moléculas efectoras tales como CD3 zeta, PKC teta y ZAP70, que están implicadas en la cascada de señalización de linfocitos T CD3. El mecanismo por medio del cual PD-1 modula a la baja las respuestas de los linfocitos T es similar, pero distinto del correspondiente a CTLA-4, ya que ambas moléculas regulan un conjunto de proteínas de señalización que se solapa (Parry et al., *Mol. Cell Biol.* 25: 9543-9553). Bennett y colaboradores han demostrado que la inhibición mediada por PD-1 de la señalización de linfocitos T únicamente es eficaz cuando las señales tanto de activación como de inhibición se producen sobre la misma superficie, lo que indica que el mecanismo de señalización de PD-1 se determina de forma espacio-temporal (Bennett F. et al., *J Immunol.* 170:711-8 (2003)).

Se ha demostrado que PD-1 se expresa sobre linfocitos activados (linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ periféricos, células B y monocitos) y también se ha demostrado que se expresa durante el desarrollo tímico sobre linfocitos T CD4⁺CD8⁻ (doble negativo) así como también en linfocitos T NK.

Los ligandos para PD-1 (PD-L1 y PD-L2) se expresan de forma constitutiva o se pueden inducir en diversos tipos celulares, incluyendo tejidos no hematopoyéticos así como también diversos tipos de tumores. PD-L1 se expresa sobre linfocitos T, células B, mieloides y dendríticas (DC), pero también sobre células periféricas, tales como células endoteliales microvasculares y órganos no linfoides tales como corazón, pulmón, etc. Por el contrario, PD-L2 únicamente se encuentra en macrófagos y DC. El patrón de expresión de los ligandos PD-1 indica un papel de PD-1 en el mantenimiento de la tolerancia periférica y puede servir para regular las respuestas de linfocitos T y B auto-reactivos en la periferia. Ambos ligandos son receptores de transmembrana de tipo I que contienen tanto dominios de tipo IgV como dominios de tipo IgC en la región extracelular. Ambos ligandos contienen regiones citoplasmáticas cortas sin motivos de señalización conocidos.

Hasta la fecha, numerosos estudios han demostrado que la interacción de PD-1 con sus ligandos conduce a la inhibición de la proliferación de linfocitos *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado que la alteración de la interacción PD-1/PD-L1 aumenta la proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas y la progresión en bloque del ciclo celular. El análisis inicial de ratones *Pdcd1*^{-/-} no identificó ningún fenotipo inmunitario drástico. Sin embargo, los ratones de edad avanzada desarrollaron enfermedades autoinmunes espontáneas que difirieron de acuerdo con la cepa sobre la cual se produjo el retro-cruzamiento de la deficiencia de *Pdcd1*. Éstas incluyen la artritis proliferativa similar al lupus (C57BL/6) (Nishimura H. et al., *Int. Immunol.* 10: 1563-1572 (1998)), la cardiomiopatía mortal (BALB/c) (Nishimura H. et al., *Science* 291: 319-322 (2001)) y la diabetes de tipo I (NOD) (Wang J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 11823-11828 (2005)). En general, el análisis de los animales nulgénicos ha conducido a la comprensión de que PD-1 funciona principalmente para inducir y regular la tolerancia periférica. De este modo, el bloqueo terapéutico del mecanismo PD-1 puede resultar útil para solucionar la tolerancia inmunitaria. Dicho bloqueo selectivo puede ser de utilidad en el tratamiento del cáncer o la infección así como en el refuerzo de la inmunidad durante la vacunación (ya sea profiláctica o terapéutica).

El papel de PD-1 en el cáncer esta establecido en la bibliografía. Se sabe que el microambiente tumoral puede proteger a las células tumorales frente a la destrucción inmunitaria eficaz. Recientemente, se ha demostrado que PD-L1 se expresa en varios tumores humanos y de ratón (y se puede inducir por medio de IFN gamma en la mayoría de estirpes celulares tumorales negativas para PD-L1) y se postula que media en la evasión inmunitaria (Iwai Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 12293-12297 (2002); Strome S.E. et al., *Cancer Res.*, 63: 6501-6505 (2003)).

En seres humanos, se ha descubierto la expresión de PD-1 (en linfocitos que se infiltran en tumores) y/o PD-L1 (en células tumorales) en varias biopsias primarias evaluadas por medio de inmunohistoquímica. Dichos tejidos incluyen cánceres de pulmón, hígado, ovario, cuello uterino, piel, colon, glioma, vejiga, mama, riñón, esófago, estómago, células escamosas orales, células uroteliales y páncreas así como también tumores de cabeza y cuello (Brown J.A. et al., *J. Immunol.* 170: 1257-1266 (2003); Dong H. et al., *Nat. Med.* 8: 793-800 (2002); Wintterle et al., *Cancer Res.* 63: 7462-7467 (2003); Strome S.E. et al., *Cancer Res.*, 63: 6501-6505 (2003); Thompson R.H. et al., *Cancer Res* 66: 3381-5 (2006); Thompson et al., *Clin. Cancer Res.*, 13: 1757-61 (2007); Nomi T. et al., *Clin. Cancer Res.* 13: 2151-7 (2007)). Más sorprendentemente, se ha correlacionado la expresión de PD-ligando sobre células tumorales con un mal pronóstico de pacientes con cáncer en múltiples tipos de tumores (revisado en Okazaki y Honjo, *Int. Immunol.* 19: 813-824 (2007)).

El bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 podría conducir a una inmunidad de linfocitos T específica de tumores potenciada y por tanto podría ser útil para la eliminación de células tumorales por parte del sistema inmunitario. Para abordar esta cuestión, se han realizado varios estudios. En un modelo murino de cáncer de páncreas agresivo, T. Nomi et al. (*Clin. Cancer Res.* 13: 2151-2157 (2007)) demostraron la eficacia terapéutica del bloqueo de PD-1/PD-L1. La administración de anticuerpo dirigido ya sea a PD-1 o PD-L1 inhibió significativamente el crecimiento tumoral. El bloqueo por anticuerpo promovió eficazmente la infiltración de linfocitos T CD8⁺ reactivos a tumores en el interior del tumor, dando como resultado la regulación positiva de los efectores antitumorales incluyendo IFN gamma, granzima B y perforina. Adicionalmente, los autores mostraron que el bloqueo de PD-1 se puede combinar eficazmente con quimioterapia para lograr un efecto sinérgico. En otro estudio, usando un modelo de carcinoma de células escamosas en ratones, el bloqueo por anticuerpos de PD-1 o PD-L1 inhibió significativamente el crecimiento tumoral (Tsushima F. et al., *Oral Oncol.* 42: 268-274 (2006)).

En otros estudios, la transfección de una estirpe de mastocitoma murino con PD-L1 condujo a una menor lisis de las células tumorales cuando se co-cultivaron con un clon de CTL específico tumoral. Se restableció la lisis cuando se añadió mAb anti-PD-L1 (Iwai Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 12293-12297 (2002)). *In vivo*, Se ha demostrado que el bloqueo de la interacción PD1/PD-L1 aumentaba la eficacia de la terapia de transferencia de linfocitos T adoptivos en un modelo tumoral de ratón (Strome S.E. et al., *Cancer Res.* 63: 6501-6505 (2003)). Pruebas adicionales del papel de PD-1 en el tratamiento del cáncer proceden de experimentos realizados con ratones nuligénicos para PD-1. Las células de mieloma que expresaban PD-L1 crecieron únicamente en animales de tipo silvestre (dando como resultado el crecimiento tumoral y la muerte animal asociada), pero no en ratones deficientes en PD-1 (Iwai Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 12293-12297 (2002)).

En estudios en humanos, R. M. Wong et al. (*Int. Immunol.* 19: 1223-1234 (2007)) demostraron que el bloqueo de PD-1 usando un anticuerpo anti-PD-1 completamente humano aumentó los números absolutos de linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor (CTL) en ensayos de estimulación *ex vivo* usando antígenos de vacuna y células de individuos vacunados. En un estudio similar, el bloqueo de anticuerpo de PD-L1 dio como resultado una actividad citolítica potenciada de los linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno asociados a tumores y una mayor producción de citocinas por los linfocitos T_H específicos de tumor (Blank C. et al., *Int. J. Cancer* 119: 317-327 (2006)). Los mismos autores demostraron que el bloqueo de PD-L1 aumenta las respuestas de los linfocitos T específicos de tumor *in vitro* en combinación con el bloqueo de anti-CTLA-4.

En general, la vía de PD-1/PD-L1 es una diana bien validada para el desarrollo de productos terapéuticos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos PD-1 también pueden ser útiles en la infección vírica crónica. Los linfocitos T CD8⁺ de memoria generados tras una infección vírica aguda son altamente funcionales y constituyen un componente importante de la inmunidad protectora. Por el contrario, con frecuencia, las infecciones crónicas se caracterizan por grados variables de impedimento funcional (agotamiento) de las respuestas de linfocitos T específicos de virus y este defecto es el motivo principal de la incapacidad del hospedador para eliminar el patógeno que persiste. Aunque inicialmente se generan los linfocitos T efectores funcionales durante las etapas tempranas de la infección, gradualmente pierden su función durante el transcurso de la infección crónica. Barber et al. (Barber et al., *Nature* 439: 682-687 (2006)) mostraron que los ratones infectados con una estirpe de laboratorio de VCML desarrollaron infección crónica dando como resultado niveles elevados de virus en sangre y otros tejidos. Inicialmente, estos ratones desarrollaron una respuesta robusta de linfocitos T, pero con el tiempo sucumbieron a la infección tras el agotamiento de los linfocitos T. Los autores descubrieron que la disminución en el número y función de los linfocitos T efectores de ratón crónicamente infectado se puede revertir por medio de la inyección de un anticuerpo que bloquee la interacción entre PD-1 y PD-L1.

Recientemente, se ha demostrado que PD-1 se expresa en gran medida sobre linfocitos T en individuos infectados con VIH y que la expresión del receptor se correlaciona con la función alterada de linfocitos T y la progresión de la enfermedad (Day et al., *Nature* 443: 350-4 (2006).; Trautmann L et al., *Nat. Med.* 12: 1198-202 (2006). En ambos estudios, el bloqueo del ligando PD-L1 aumentó significativamente la expansión de células que producen IFN-gamma específicas de VIH *in vitro*.

Otros estudios implican la importancia de la vía de PD-1 para el control de la infección vírica. Los ratones nuligénicos para PD-1 presentan un mejor control de la infección por adenovirus que los ratones de tipo silvestre (Iwai et al., *J.*

Exp. Med. 198: 39-50 (2003)). Además, la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de VHB a animales transgénicos VHB dio lugar a la aparición de hepatitis (Isogawa M. et al., *Immunity* 23: 53-63 (2005)). La patología de estos animales oscila como consecuencia del reconocimiento de antígeno en el hígado y la regulación positiva de PD-1 en células hepáticas.

5 El documento WO2006/121168 desvela anticuerpos monoclonales, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen específicamente a PD-1 con una elevada afinidad, junto con métodos para la detección de PD-1 y para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer y enfermedades infecciosas, usando dichos anticuerpos anti-PD-1

10 El documento US 2006/210567 desvela anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que pueden actuar como agonistas y/o antagonistas de PD-1, modulando de ese modo las respuestas inmunitarias en general y las mediadas por TcR y CDD28, en particular.

15 El documento US6808710 desvela anticuerpos humanos específicos para PD-1 humano y su uso para la regulación positiva de la respuesta inmunitaria y para el tratamiento de tumores.

Breve resumen de la invención

20 La invención se refiere a las realizaciones como se definen en el presente documento.

La invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo aislados que se unen a PD-1 humano, que comprenden: CDR de cadena ligera SEQ ID NO: 9, 10 y 11 y CDR de cadena pesada SEQ ID NO: 12, 13 y 14, de manera que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo bloquea a la unión de PD-L1 humano y PD-L2 humano a PD-1 humano.

25 La invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento del cáncer o una infección o enfermedad infecciosa.

30 La invención proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpo aislados que se unen a PD-1 humano y cino. En algunas realizaciones, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo bloquean la unión de PD-L1 humano y PD-L2 humano a PD-1 humano. El anticuerpo PD-1 o fragmento de anticuerpo PD-1 de la invención incluye las CDR (Regiones determinantes de la complementariedad de anticuerpos) de SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 y 14; y, en realizaciones adicionales, incluye una o más CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 12, 13 y 14 y las CDR de cadena ligera de SEQ ID NO: 9, 10 y 11. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un fragmento de los mismos.

35 En una realización, la invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo aislados que se unen a PD-1 humano que comprende: una cadena ligera que comprende CDR de SEQ ID NO: 9, 10 y 11, o variantes de cualquiera de dichas secuencias; y/o un cadena pesada que comprende CDR de SEQ ID NO: 12, 13 y 14 o variantes de cualquiera de dichas secuencias.

40 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo aislados que se unen a un PD-1 humano que comprende: una cadena ligera que comprende CDR de SEQ ID NO: 15, 16 y 17 o variantes de cualquiera de dichas secuencias; y/o un cadena pesada que comprende CDR de SEQ ID NO: 18, 19 y 20 o variantes de cualquiera de dichas secuencias.

45 En una realización, la invención comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 5 o una variante de la misma; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una SEQ ID NO: 6 o una variante de la misma.

50 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma; y/o una región variable de cadena ligera que comprende una SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma.

55 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 139 de la SEQ ID NO: 30 o una variante de la misma; y/o una región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 130 de la SEQ ID NO: 32 o una variante de la misma.

60 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 139 de la SEQ ID NO: 30 o una variante de la misma; y/o una región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 130 de la SEQ ID NO: 33 o una variante de la misma.

65 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena

ES 2 616 355 T3

pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 139 de la SEQ ID NO: 30 o una variante de la misma; y/o una región variable de cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 130 de la SEQ ID NO: 34 o una variante de la misma.

5 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de homología con los restos de aminoácidos 20 a 139 de la SEQ ID NO: 30; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de homología con los restos de aminoácidos 20 a 130 de la SEQ ID NO: 32, 33 o 34.

10 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que se unen a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 466 de la SEQ ID NO: 31 o una variante de la misma y/o una cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 237 de la SEQ ID NO: 36 o una variante de la misma.

15 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que se unen a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 466 de la SEQ ID NO: 31 o una variante de la misma y/o una cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 237 de la SEQ ID NO: 37 o una variante de la misma.

20 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que se unen a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 466 de la SEQ ID NO: 31 o una variante de la misma y/o una cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 237 de la SEQ ID NO: 38 o una variante de la misma.

25 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que se unen a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 469 de la SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma y/o una cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 237 de la SEQ ID NO: 36 o una variante de la misma.

30 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que se unen a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 469 de la SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma y/o una cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 237 de la SEQ ID NO: 37 o una variante de la misma.

35 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que se unen a un PD-1 humano que comprende: una cadena pesada que comprende los restos de aminoácidos 20 a 469 de la SEQ ID NO: 35 o una variante de la misma y/o una cadena ligera que comprende los restos de aminoácidos 20 a 237 de la SEQ ID NO: 38 o una variante de la misma.

40 La variante del anticuerpo o un fragmento de anticuerpo pueden comprender una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificados de forma conservativa.

45 El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo pueden comprender una región constante de cadena pesada o una variante de la misma, en la que la variante comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos modificados de forma conservativa; y/o una región constante de cadena ligera humana o una variante de la misma, en la que la variante comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos modificados de forma conservativa. En algunas realizaciones, la variante puede comprender hasta 10 sustituciones de aminoácidos modificados de forma conservativa. En algunas realizaciones, la variante puede comprender hasta 5 sustituciones de aminoácidos modificados de forma conservativa. En algunas realizaciones, la variante puede comprender hasta 3 sustituciones de aminoácidos modificados de forma conservativa. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la región constante de cadena pesada humana o variante de la misma puede ser del isotipo IgG1 o IgG4.

55 El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se pueden unir a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 100 pM o menor. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a un PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 30 pM o menor. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir al PD-1 humano con aproximadamente la misma K_D que el anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ. ID NO: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ. ID NO: 32. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con aproximadamente la misma K_D que el anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 33.

65 El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se pueden unir a PD-1 humano con una k_{asoc} de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ 1/M-s o más rápida. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una k_{asoc} de aproximadamente 1×10^6 1/M-s o más rápida.

El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se pueden unir a PD-1 humano con una k_{disoc} de aproximadamente 2×10^{-5} 1/s o más lenta. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una k_{disoc} de aproximadamente $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una k_{disoc} de aproximadamente 3×10^{-5} 1/s o más lenta.

5 Los valores de K_D , k_{asoc} y k_{disoc} se pueden medir usando cualquier método apropiado. En realizaciones preferidas, la constante de disociación se mide usando interferometría de bio-luz (por ejemplo, el procedimiento ForteBio Octet descrito en el Ejemplo 2). En otras realizaciones preferidas, la constante de disociación se puede medir usando resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, Biacore) o Kinexa.

10 El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la invención pueden bloquear la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una CI_{50} de aproximadamente 1 nM o menor. El bloqueo de la unión de ligando se puede medir y la CI_{50} se puede calcular usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, los métodos FACS o FRET que se describen en los ejemplos a continuación en el presente documento.

15 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que compiten por un epítipo sobre PD-1 humano de unión con cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente y que bloquea la unión de PD-L1 humano o PD-L2 humano a PD-1 humano con una CI_{50} de aproximadamente 1 nM o menor.

20 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que compiten por un epítipo sobre PD-1 humano de unión con cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente y que se une a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 100 pM o menor. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 30 pM o menor.

25 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que compiten por un epítipo sobre PD-1 humano de unión con cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente y que se une a PD-1 humano con aproximadamente la misma K_D que un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 32.

30 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que compiten por un epítipo sobre PD-1 humano de unión con cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente y que se une a PD-1 humano con aproximadamente la misma K_D que un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 33.

35 Se desvela un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que compite por un epítipo sobre PD-1 humano de unión con cualquiera de los anticuerpos anteriormente descritos y que se une a PD-1 con una k_{asoc} de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ 1/M-s o más rápida. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una k_{asoc} de aproximadamente 1×10^6 1/M-s o más rápida.

40 Se desvela un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que compiten por un epítipo sobre PD-1 humano de unión con cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente y que se une a PD-1 humano con una k_{disoc} de aproximadamente 2×10^{-5} 1/s o más lenta. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una k_{disoc} de aproximadamente $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s o más lenta. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede unir a PD-1 humano con una k_{disoc} de aproximadamente 3×10^{-5} 1/s o más lenta.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpo de la invención son anticuerpos quiméricos o fragmentos de anticuerpos quiméricos.

50 En algunas realizaciones, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpo de la invención son anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpo de la invención son anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos humanizados.

55 En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos de anticuerpo Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv o F(ab')₂.

En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpo son diacuerpos.

60 Se desvelan anticuerpos biespecíficos que comprenden uno cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo descritos anteriormente que se unen a PD-1 humano.

65 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 aislados y los fragmentos de anticuerpo de la invención aumentan la activación de linfocitos T medida gracias a medios típicos conocidos por el experto en la materia (incluyendo, pero sin limitación, una mayor proliferación de células inmunológicas, una mayor secreción de citocina o

la expresión de marcadores de activación tales como CD25 y/o CD69).

5 En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede potenciar la respuesta inmunitaria tras la estimulación con Enterotoxina B de *Staphylococcus* o Toxide Tetánico *ex vivo* o *in vivo*. Se puede determinar la mayor activación inmunitaria usando procedimientos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, cuantificando la proliferación de células inmunitarias (tales como linfocitos T) o la producción de citocinas por parte de las células inmunitarias (por ejemplo, la producción de IFN γ o IL-2 por parte de los linfocitos T).

10 La invención también comprende ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de anticuerpos de la invención. Se incluyen en la invención ácidos nucleicos que codifican una cualquiera de las secuencias de aminoácidos desveladas en las SEQ ID NO: 5 y 6 (con o sin secuencias predominantes). También se incluyen en la invención ácidos nucleicos que comprenden las SEQ ID NO: 1 y 2 (con o sin ácidos nucleicos que codifican las secuencias predominantes).

15 La invención también comprende células y vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpo de la invención. Además, la invención comprende un método para producir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención que comprende: (a) cultivar la célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención en un medio de cultivo en condiciones en las que se expresa la secuencia de ácido nucleico, produciendo de este modo polipéptidos que comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada; y (b) recuperar los polipéptidos a partir de la célula hospedadora o medio de cultivo.

20 La invención también comprende composiciones que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención en combinación con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 La invención también comprende un método para aumentar la actividad de células inmunitarias, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención. En una realización, se puede usar el método para tratar el cáncer. En otra realización, se puede usar el método como adyuvante de vacunas. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un segundo agente terapéutico o modalidad de tratamiento.

30 En algunas realizaciones, la invención comprende un método para aumentar la actividad de una célula inmunitaria, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención y que comprende adicionalmente medir la activación de los linfocitos T *ex vivo* en una muestra procedente del sujeto, en el que un aumento en la actividad de los linfocitos T indica que se debe continuar el tratamiento. En otras realizaciones, la invención comprende un método para aumentar la actividad de una célula inmunitaria, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención y que además comprende medir la activación de los linfocitos T *ex vivo* en una muestra procedente del sujeto, en el que un aumento de la actividad de los linfocitos T predice la posibilidad de que el tratamiento resulte satisfactorio. En una realización, el aumento de la actividad de los linfocitos T se determina mediante: (i) la medición de la producción inducida por SEB de una o más citocinas seleccionadas entre el grupo que consiste en IL-2; TNF α , IL-17, IFN γ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 e IL-13; o (ii) la medición de la producción inducida por TT de una citocina seleccionada entre el grupo que consiste en: IL-2, TNF α , IL-17, IFN γ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 y IL-13.

35 La invención también comprende el uso de un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento para aumentar la respuesta inmunitaria.

40 La invención también comprende el uso de un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento para tratar el cáncer.

45 La invención también comprende el uso de un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo de la invención como adyuvante de vacuna.

50 Se desvela un inmunocombinado que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo de la invención, unido a un agente terapéutico tal como una toxina bacteriana o una radiotoxina. Los ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos incluyen taxol, citochalasina B, mitomicina, etopósido y vincristina u otros antimetabolitos, agentes alquilantes, antibióticos y antimetabólicos.

55 La invención también comprende un método para aumentar la actividad, o reducir la modulación a la baja, de una célula inmunitaria poniendo en contacto la célula inmunitaria con uno cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. Este método se podría usar para tratar el cáncer o enfermedades infecciosas (tales como infecciones víricas crónicas) o se podría usar como adyuvante para una vacuna profiláctica o terapéutica.

La invención también comprende un método para aumentar la respuesta inmunitaria a un antígeno, que comprende poner en contacto una célula inmunitaria con un antígeno y un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo tal como un aumento o potenciación de la respuesta inmunitaria al antígeno. Este método se podría realizar *in vivo* (en un sujeto) o *ex vivo*.

5 Un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de anticuerpo se puede combinar con un segundo agente terapéutico o modalidad de tratamiento. En una realización, se puede combinar un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de anticuerpo con tratamientos para el cáncer que implican la aplicación de citocinas o factores inmunitarios segregados recombinantes. Los ejemplos no limitantes de las combinaciones incluyen combinar un anticuerpo anti-PD-1 con IL-2
10 recombinante o IFN α 2 recombinante para el tratamiento del melanoma o el carcinoma de células renales. La IL-2 recombinante potencia la excrecencia de los linfocitos T en pacientes con cáncer. El IFN α 2 recombinante inhibe la proliferación celular de cáncer pero también aumenta la expresión de los ligandos inhibidores para PD-1 en células cancerígenas, células que presentan antígenos y otras células somáticas en los pacientes tratados. Se puede combinar anti-PD-1 con otras citocinas que se podrían considerar útiles para el tratamiento del cáncer o
15 enfermedades infecciosas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo se pueden combinar con una vacuna para prevenir o tratar el cáncer o una enfermedad infecciosa. Como ejemplo no limitante, se podría combinar anti-PD-1 con una proteína, péptido o vacuna de ADN que contenga uno o más antígenos que sean relevantes para
20 el cáncer o infección objeto de tratamiento, o una vacuna que comprenda células dendríticas pulsadas con dicho antígeno a). Otra realización incluye el uso de un anti-PD-1 con una célula cancerígena (atenuada) o vacunas víricas completas. Una realización implica una combinación de una terapia anti-PD-1 con una vacuna para el cáncer de células completas que se somete a estudio técnico para segregar GM-CSF.

25 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo se pueden combinar con el tratamiento que se considera el tratamiento de referencia del cáncer o una enfermedad infecciosa. El fundamento para dichas combinaciones es que la mayor activación inmunitaria simultánea por medio de PD-1 induce o facilita la respuesta clínica inicial al tratamiento de referencia, induce una respuesta clínica duradera y el control inmunitario a largo plazo de la enfermedad.

30 En una realización, el tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo se puede combinar con quimioterapia. La quimioterapia que usa agentes citotóxicos tiene como resultado la muerte de las células cancerígenas aumentando la liberación de antígenos tumorales. Dicha disponibilidad mayor de antígeno tumoral puede dar como resultado la sinergia con el tratamiento anti-PD-1. Se proporciona un ejemplo no limitante por medio
35 del uso de dacarbazina o temozolomida para el tratamiento del melanoma y gemcitabina para el cáncer de páncreas.

En una realización, el tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo se puede combinar con radioterapia. La radioterapia induce la muerte de las células cancerosas y aumenta la disponibilidad de antígenos tumorales para la presentación y activación de células inmunitarias.

40 En otra realización, el tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo se puede combinar con cirugía para retirar las células cancerosas de un sujeto.

45 En otras realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpos se pueden combinar con terapias que pueden dar como resultado el bloqueo de PD-1 incluyendo agentes dirigidos usados para la privación o inhibición de la angiogénesis o proteínas dirigidas activas en células tumorales, todo ello dando como resultado una muerte de células tumorales potenciada y la disponibilidad de antígenos tumorales estimuladores inmunitarios. En combinación con un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de anticuerpo, una mayor activación de linfocitos T puede dar como
50 resultado un control inmunitario duradero del cáncer.

En algunas realizaciones se puede combinar un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de anticuerpo con otro anticuerpo terapéutico útil para el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa. Se proporciona un ejemplo no limitante por medio de la combinación de un anti-PD-1 con un anticuerpo que se dirige a Her2/neu o que se dirige al receptor EGF. En otro ejemplo no limitante, se combina un anticuerpo PD-1 o un fragmento de anticuerpo con un tratamiento
55 dirigido a VEGF o a sus receptores. En otra realización, se combina un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de anticuerpo con anti-CTLA-4. En otro ejemplo no limitante, se combina anti-PD-1 con un anticuerpo que se dirige a RSV.

Breve descripción de los dibujos

60 La Figura 1A y 1B muestran los resultados de los experimentos que demuestran que los anticuerpos inmovilizados a partir de sobrenadantes de hibridoma son capaces de reducir la secreción de IL-2 por las células Jurkat E6.2.11 estimuladas con anti-CD3 inmovilizado y anti-CD28 soluble.

65 La Figura 2 muestra el resultado de experimentos que demuestran que los anticuerpos frente a PD-1 humano se unen a PD-1. La Figura 2A es un gráfico que muestra la unión dependiente de la dosis de anticuerpos anti-PD-1

a PD-1/Fc purificado en ELISA de proteínas. La Figura 2B es un gráfico que muestra la unión dependiente de la dosis de anticuerpos anti-PD-1 a PD-1 expresados sobre la superficie de células CHO sometidas a transfección con hPD-1 en un CELISA.

5 La Figura 3 muestra los resultados de los experimentos de FMAT que demuestran que los anticuerpos frente a PD-1 compiten para unir PD-L1 y PD-L2 a células CHO sometidas a transfección con PD-1 humano. La Figura 3A es un gráfico que muestra la inhibición dependiente de la dosis de PD-L1 por hPD-1,08A y hPD-1,09A y en menor medida por J116. La Figura 3B es un gráfico que muestra la inhibición dependiente de la dosis de PD-L2.

10 La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra los resultados de los experimentos que demuestran que se potencia la producción de IL-2 estimulada con SEB por medio de células sanguíneas de donante sano en presencia de anticuerpos anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA-4. Las barras muestran el número promedio de veces de aumento de IL-2 para los donantes (\pm ETM). Los números debajo de cada barra indican el número de donantes representados. El (m)IgG1 de ratón es el control de isotipo para anti-PD-1,08A (08A), anti-PD-1,09A (09A) y anti-PD-L1. El (m)IgG2a de ratón es el control de isotipo para anti-CTLA-4. Se compara cada valor de IL-2 con su propio control para determinar el cambio en número de veces (un cambio en número de veces de IL-2 que adopta un valor de 4 significa un aumento del 400 % en la producción de IL-2 en comparación con SEB solo). Ninguno = SEB solo.

20 La Figura 5 muestra los resultados de los experimentos que demuestran que los anticuerpos anti-PD-1 favorecen la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocinas (IL-2 e IFN γ) cuando se estimulan con el toxoide tetánico de antígeno de recuerdo. La Figura 5 muestra la secreción de IFN γ dependiente de la concentración.

25 La Figura 6 es un gráfico que muestra las tasas de K_{asoc} y K_{disoc} para anticuerpos anti-PD-1 medidas por medio de interferometría de bio-luz. Las líneas diagonales indican los valores de K_D calculados teóricos. Los anticuerpos se listan a la derecha por K_D en orden ascendente.

30 La Figura 7 es un gráfico de barras de los resultados de los experimentos que demuestra que se aumenta la producción de IL-2 estimulada con SEB por células sanguíneas de donantes sanos en presencia de 25 ug/ml de anticuerpos anti-PD-1 murinos (091) o humanizados (h409A11, h409A16 y h409A17). Las barras muestran el aumento promedio en número de veces en IL-2 para los tres donantes (+ ETM). IgG1 de ratón (m, del inglés *mouse*) es el control de isotipo para anti-PD-1,09A (09A). IgG4 humano (h) es el control de isotipo para los anticuerpos h409A11, h409A16 y h409A17. Se compara cada valor de IL-2 con su propio control para determinar el cambio en número de veces. Ninguno = SEB solo.

35

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas y definiciones

40 A lo largo de la descripción detallada y los ejemplos de la invención se usarán las siguientes abreviaturas:

hPD-1.08A	Anticuerpo anti-hPD-1 monoclonal murino
hPD-1.09A	Anticuerpo anti-hPD-1 monoclonal murino
08A-VH	VH aislado a partir de hibridoma hPD-1.08A
08A-VK	VK aislado a partir de hibridoma hPD-1.08A
09A-VH	VH aislado a partir de hibridoma hPD-1.09A
09A-VK	VK aislado a partir de hibridoma hPD-1.09A
c109A	Versión quimérica de IgG1 de anticuerpo hPD-1.09A
c109A-VH	Cadena pesada quimérica, que consiste en 09A-VH murino fusionado con una región constante de IgG1
c109A-VK	Cadena pesada quimérica, que consiste en 09A-VK murino fusionado con una región constante kappa
109A-H	Secuencia de cadena pesada de IgG1 09A humanizado con cero retro mutaciones
409A-H	Secuencia de cadena pesada de IgG4-09A humanizado con cero retro mutaciones FWR
K09A-L-11	Secuencia 09A-kappa humanizada con armazón que tiene originalmente una longitud de CDR1 de 11 AA
K09A-L-16	Secuencia 09A-kappa humanizada con armazón que tiene originalmente una longitud de CDR1 de 16 AA
K09A-L-17	Secuencia 09A-kappa humanizada con armazón que tiene originalmente una longitud de CDR1 de 17 AA
h409A11	Versión de IgG4 humanizada de anticuerpo 09A que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de 409A-H y una cadena ligera que comprende la secuencia de K09A-L-11
h409A16	Versión de IgG4 humanizada de anticuerpo 09A que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de 409A-H y una cadena ligera que comprende la secuencia de K09A-L-16
h409A17	Versión de IgG4 humanizada de anticuerpo 09A que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de 409A-H y una cadena ligera que comprende la secuencia de K09A-L-17

hPD-1	proteína PD-1 humanizada
CDR	Región determinante de la complementariedad en las regiones variables de inmunoglobulina, definida usando el sistema de numeración de Kabat
CE50	concentración que tiene como resultado una unión o eficacia del 50 %
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FW	Región armazón de anticuerpo: las regiones variables de inmunoglobulina que excluyen las regiones de CDR
HRP	peroxidasa de rábano rusticano
IL-2	interleucina 2
IFN	interferón
CI50	concentración que tiene como resultado una inhibición de 50 %
IgG	Inmunoglobulina G
Kabat	Una alineación de inmunoglobulina y sistema de numeración guiado por Elvin A Kabat
mAb	anticuerpo monoclonal
MES	Acido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
NHS	Suero humano normal
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
SAM	Anticuerpo policlonal anti-ratón (IgG) de oveja
región V	El segmento de las cadenas de IgG que es variable en la secuencia entre los diferentes anticuerpos. Se extiende hasta el resto 109 de Kabat en la cadena ligera y 113 en la cadena pesada
VH	Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina
VK	Región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina

"Anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que presenta la actividad biológica deseada, tal como la unión inhibidora de un ligando a su receptor, o por medio de la señalización inducida por ligando inhibidor de un receptor. De este modo, "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y específicamente abarca, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos).

"Fragmento de anticuerpo" y "fragmento de unión a anticuerpo" significan fragmentos de unión a anticuerpo y análogos de un anticuerpo, que normalmente incluyen al menos una parte de la unión de antígeno o regiones variables (por ejemplo, una o más CDR) del anticuerpo parental. Un fragmento de anticuerpo parental retiene al menos parte de la especificidad de unión del anticuerpo parental. Normalmente, un fragmento de anticuerpo retiene al menos el 10 % de la actividad de unión parental cuando se expresa la actividad en base molar. Preferentemente, un fragmento de anticuerpo retiene al menos el 20 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % o más de la afinidad de unión del anticuerpo por la diana. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitarse a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena individual; por ejemplo, sc-Fv, unicuerpos (tecnología de Genmab); nanocuerpos (tecnología de Domantis); anticuerpos de dominio (tecnología de Ablynx); y anticuerpos multiespecíficos formados partir de fragmentos de anticuerpo. Se revisan las variantes de anticuerpos sometido a estudio técnico en Holliger y Hudson (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1126-1136.

Un "fragmento Fab" está formado por una cadena ligera y las regiones variables C_{H1} de una cadena pesada. La cadena pesada de la molécula de Fab no puede formar un enlace de disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Una región "Fc" contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios C_{H1} y C_{H2} de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen juntos por medio de dos o más enlaces de disulfuro y por medio de interacciones hidrófobas de los dominios CH3.

Un "fragmento Fab" contiene una cadena ligera y una parte de una cadena pesada que contiene el dominio V_H y el dominio C_{H1} y también la región entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de manera que se puede formar un enlace de disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de los dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')₂.

Un "fragmento F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una parte de la región constante entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de manera que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. De este modo, un fragmento F(ab')₂ está formado por dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por medio de un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La "región Fv" comprende las regiones variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras, pero carece de regiones constantes.

Un "anticuerpo Fv de cadena individual" (o "anticuerpo scFv") se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido individual. De manera general, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun (1994) *THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, vol. 113, Rosenberg y

Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315. Véase también, la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 88/01649 y las patentes de los EE.UU. N.º 4.946.778 y 5.260.203.

5 Un "diacuerpo" es un fragmento de anticuerpo pequeño con dos sitios de unión a antígeno. El fragmento comprende un dominio (V_H) variable de cadena pesada conectado a un dominio (V_L) variable de cadena ligera en la misma cadena de polipéptido (V_H-V_L o V_L-V_H). Por medio del uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más en detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161 y Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.

15 Un "fragmento de anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene únicamente la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, se unen covalentemente dos o más regiones V_H con un enlazador de péptido para crear un fragmento de anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones V_H de un fragmento de anticuerpo de dominio bivalente se pueden dirigir a antígenos iguales o diferentes.

20 Un fragmento de anticuerpo de la invención puede comprender una parte suficiente de la región constante para permitir la dimerización (o multimerización) de cadenas ligeras que se presentan capacidad reducida de enlace disulfuro, por ejemplo cuando se altera al menos una de las cisteínas de bisagra que normalmente se ven implicadas en el enlace disulfuro entre cadenas pesadas, como se describe en la presente memoria. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprenda la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas que normalmente se asocian a la región Fc cuando se encuentra presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión de FcRn, la modulación de la vida media del anticuerpo, la función ADCC y/o la unión al complemento (por ejemplo, cuando el anticuerpo tiene un perfil de glucosilación necesario para la función ADCC o la unión de complementos).

30 El término anticuerpo "quimérico" se refiere a anticuerpos en los cuales una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos procedentes de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la o las cadenas es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos procedentes de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de dichos anticuerpos, con tal de que presenten la actividad biológica deseada (Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 4.816.567 y Morrison et al. 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855).

40 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima procedente de una inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos de receptor) en las cuales se sustituyen los restos procedentes de una región hipervariable del receptor por restos procedentes de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la Región armazón (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo de receptor y anticuerpo de donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado, comprenderá sustancialmente todo de al menos uno y normalmente dos dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprende al menos una parte de una región (Fc) constante de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

55 La expresión "región hipervariable", como se usa en el presente documento, se refiere a restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácido procedentes de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR", definida por la alineación de secuencias, por ejemplo restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de cadena pesada; véase Kabat et al., 1991, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Services, National Institutes of Health, Bethesda, Md. y/o los restos procedentes de un "bucle hipervariable" (HVL), como se definen estructuralmente, por ejemplo, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; véase Chothia y Leskl, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917. Los restos de "armazón" o "FR" son los restos de dominio variable diferentes de los restos de región hipervariable que se definen en el presente documento.

65 Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un

anticuerpo producido por un humano y/o que se ha generado usando cualesquiera de las técnicas para la preparación de anticuerpos humanos como se describe en el presente documento. Esta definición excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

5 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico y terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos y no proteínicos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se purifica (1) hasta más del 95 % en peso del anticuerpo, como viene determinado por medio del método de Lowry y mucho más preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos internos o N-terminales por medio del uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad por medio de SDS-PAGE usando condiciones reductoras y no reductoras empleando azul de Coomassie o, preferentemente, tinte de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ con células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no está presente. Sin embargo, habitualmente, se puede preparar el anticuerpo aislado por medio de al menos una etapa de purificación.

20 Un molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula contaminante de ácido nucleico que comúnmente se asocia a la fuente natural de ácido nucleico del anticuerpo. La molécula de ácido nucleico aislada es diferente de la forma o configuración en la cual se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal y como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico presente en las células que expresan habitualmente el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una posición cromosómica diferente de la de las células naturales.

25 La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos exceptuando las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico individual. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante individual del antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de la población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no se interpreta como que requieren la producción del anticuerpo por medio de cualquier método particular. Por ejemplo, se pueden preparar los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención por medio del método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., 1975, *Nature* 256: 495 o se puede preparar por medio de métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos de bacteriófagos usando técnicas descritas en Clackson et al., 1991, *Nature* 352: 624-628 y Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, por ejemplo. De manera específica, los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos".

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "células inmunitarias" incluye células que son de origen hematopoyético y que desempeñan un papel en la respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias incluyen linfocitos, tales como células B y linfocitos T; linfocitos citotóxicos naturales, células mieloides, tales como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

50 Como se usa en el presente documento, un "inmunocnjugado" se refiere a un anticuerpo anti-PD-1, o uno de sus fragmentos, conjugado a un resto terapéutico, tal como una toxina bacteriana, un fármaco citotóxico o una radiotoxina. Se pueden conjugar los restos tóxicos a anticuerpos de la invención usando métodos disponibles en la técnica.

En el presente documento, se usan los siguientes códigos de ambigüedad de ácido nucleico: R = A o G; Y = C o T; M = A o C; K = G o T; S = G o C; y W = A o T.

55 Como se usa en el presente documento, una "variante" de secuencia se refiere a una secuencia que difiere de la secuencia divulgada en uno o más restos de aminoácido pero que conserva la actividad biológica de la molécula resultante.

60 "Variantes modificadas de forma conservativa" o "sustitución de aminoácido conservativa" se refieren a sustituciones de aminoácidos que son conocidas por los expertos en la materia y que, generalmente, se puede realizar sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la materia reconocerán que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4ª edición 1987)). Preferentemente, dichas sustituciones de ejemplo se preparan de acuerdo con lo que se explica a continuación:

65

Sustituciones de Aminoácido Conservativas de ejemplo

Resto Original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M) Phe (F)	Leu; Ile; Tyr Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

5 Como se usa en el presente documento, "% de identidad" entre dos secuencias se refiere a una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ de posiciones totales x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias se pueden conseguir usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácido se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, se puede determinar el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos usando un algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), bien usando una matriz Blossum 15 62 o bien usando una matriz PAM250 y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una longitud de hueco de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

20 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a un valor que se encuentra dentro del intervalo de error aceptable para el valor particular, determinado por el experto habitual en la técnica. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar 1 o más de 1 desviación típica para la práctica de la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" o "comprende esencialmente" puede significar un intervalo de hasta el 20 %. Además, en particular con respecto a los sistemas biológicos o procesos, los términos pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces un valor. Cuando se proporcionan valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se afirme lo contrario, se debería asumir que el significado de "aproximadamente" o 25 "comprende esencialmente" se encuentra dentro de un intervalo de error aceptable para ese valor particular.

30 Se une "específicamente", cuando se hace referencia a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno u otro par de unión, indica una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, por ejemplo, PD-1, en una población heterogénea de proteínas y/u otras sustancias biológicas. De este modo, en las condiciones designadas, un ligando/antígeno especificado se une a un receptor/anticuerpo particular y no se une a una cantidad significativa de otras proteínas presentes en la muestra.

35 "Administración" y "tratamiento", según se aplique a un animal, humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refiere a la puesta en contacto de una sustancia farmacéutica exógena, sustancia terapéutica, agente diagnóstico o composición para el animal, humano, sujeto, células, tejido, órgano o fluido biológico. "Administración" y "tratamiento" puede hacer referencia, por ejemplo, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, diagnósticos, de investigación y experimentales. El tratamiento de una célula abarca poner en contacto un reactivo con la célula, así como también poner en contacto el reactivo con un fluido, en el que el fluido está en contacto con la célula. "Administración" y "tratamiento" también significan tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una 40 célula, por medio de un reactivo, diagnóstico, composición de unión o por medio de otra célula.

45 "Cantidad eficaz" abarca una cantidad suficiente para aliviar o prevenir un síntoma o signo de la condición médica. Cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar la diagnosis. Una cantidad eficaz para un sujeto particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad objeto de tratamiento, la salud global del paciente, la vía del método y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios.

Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o protocolo de dosificación que evite los efectos secundarios significativos o efectos tóxicos. El efecto tiene como resultado una mejora de la medición de diagnóstico o el parámetro en al menos 5 %, por lo general al menos el 10 %, más por lo general al menos el 20 %, mucho más por lo general al menos el 30 %, preferentemente al menos el 40 %, más preferentemente al menos el 50 %, mucho más preferentemente al menos el 60 %, de manera ideal al menos el 70 %, de manera más ideal al menos el 80 % y de manera mucho más ideal al menos el 90 %, en el que 100 % se define como el parámetro de diagnóstico mostrado por un sujeto normal (véase, por ejemplo, Maynard et al. (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Ratón, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, Reino Unido).

Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales para PD-1 se pueden preparar de acuerdo con el conocimiento y la experiencia en la técnica para inyectar un antígeno de PD-1 a sujetos de ensayo y posteriormente aislar hibridomas que expresan anticuerpos que tienen las secuencias o las características funcionales deseadas.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se somete a secuenciación usando procedimientos convencionales (por ejemplo, por medio del uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que posteriormente se someten a transfección en el interior de células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células de COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que, de otro modo, no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. A continuación, se describe la producción recombinante de anticuerpos con más detalle.

En otra realización, se pueden aislar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a partir de bibliotecas de bacteriófagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty et al., 1990 *Nature*, 348:552-554. Clackson et al., 1991, *Nature*, 352:624-628 y Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de bacteriófagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por medio del intercambio de cadenas (Marks et al., 1992, *Bio/Technology*, 10: 779-783) así como también la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para la construcción de bibliotecas de bacteriófagos muy grandes (Waterhouse et al., 1993, *Nuc. Acids. Res.* 21: 2265-2266). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Anticuerpos Híbridos

El ADN de anticuerpo también se puede modificar, por ejemplo, por medio de sustitución de la secuencia de codificación para los dominios constantes humanos de cadena pesada y cadena ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de los EE.UU. N.º 4.816.567; Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acada. Sci. USA*, 81:6851) o por medio de unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina de todo o parte de la secuencia de codificación para el material que no es de inmunoglobulina (por ejemplo, dominios de proteína). Normalmente, dicho material que no es de inmunoglobulina está sustituido por los dominios constantes de un anticuerpo, o está sustituido por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente híbrido que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Anticuerpos Humanos y Humanizados

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos de una fuente que no es humana. Los restos de aminoácidos no humanos, con frecuencia, se denominan restos de "importación" y normalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar generalmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522.525; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332: 323-327; Verhoeven et al., 1988, *Science* 239; 1534-1536) por medio de sustitución de las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano por secuencias de CDR o CDR de roedor. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de los EE.UU. N.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los cuales se sustituyen algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se usan en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir el carácter antigénico. De acuerdo con el denominado método del "mejor ajuste", se contrasta la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor frente a una

biblioteca completa de secuencias conocidas de dominio variable humano. A continuación, se acepta la secuencia humana que se encuentra más próxima a la del roedor como los armazones humanos (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., 1987, *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia et al., 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901). Otro método usa un armazón particular procedente de las secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar el mismo armazón para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285; Presta et al., 1993, *J. Immunol.* 151:2623).

También es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de la elevada afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados por medio de un proceso de análisis de secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales se encuentran habitualmente disponibles y resultan familiares para los expertos en la materia. Los programas de ordenador se encuentran disponibles e ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias candidatas de inmunoglobulina seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite el análisis del posible papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, se pueden escoger los restos de FR y se pueden combinar a partir de secuencias de receptor y de importación de manera que se obtengan las características de anticuerpo deseadas, tales como mayor afinidad por el o los antígenos diana. En general, los restos de CDR están implicados directa y sustancialmente en influir en la unión de antígeno.

La humanización de anticuerpos es una tarea sencilla de ingeniería de proteínas. Se pueden humanizar casi todos los anticuerpos murinos por medio del injerto de CDR, dando lugar a la retención de la unión de antígeno. Véase, Lo, Benny, K.C., editor, en *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, volumen 248, Humana press, Nueva Jersey, 2004.

Como alternativa, ahora resulta posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones de mutantes de línea germinal tiene como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la prueba de antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551; Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362: 255-258; Bruggermann et al., 1993, *Year in Immunology* 7: 33; y Duchosal et al., 1992, *Nature* 355: 258. Los anticuerpos humanos también pueden proceder de bibliotecas de presentación de bacteriófagos (Hoogenboom et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 227: 381; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 1991, 222: 581-597; Vaughan et al., 1996, *Nature Biotech* 14: 309).

Purificación de Anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, se puede producir el anticuerpo por vía intracelular, en el espacio periplásmico, o se puede segregar directamente en el medio. Si se produce el anticuerpo por vía intracelular, como primera etapa, se retira el residuo en forma de partículas, ya sean células de hospedador o fragmentos sometidos a lisis, por ejemplo, por medio de centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 163-167 describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son segregados al espacio periplásmico de *E. Coli*. Brevemente, se descongela la pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Se pueden retirar los residuos celulares por medio de centrifugación. Cuando se segrega el anticuerpo en el interior del medio, generalmente en primer lugar se concentran los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración de Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar la proliferación de contaminantes adventicios.

Se puede purificar la composición de anticuerpos preparada a partir de las células usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis y cromatografía de afinidad, prefiriéndose la cromatografía de afinidad como técnica de purificación. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies e isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Se puede usar la proteína A para purificar anticuerpos a base de cadenas pesadas gamma 1, gamma 2 o gamma 4 humanas (Lindmark et al., 1983, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para gamma 3 humana (Guss et al., 1986, *EMBO J* 5: 1567-1575). Con la mayor frecuencia, la matriz a la cual se une el ligando de afinidad es agarosa, pero otras matrices se encuentran disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos de los que se pueden conseguir con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) resulta útil para la purificación. Otras técnicas para purificación de proteínas tales como separación en columna de intercambio iónico, precipitación de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina,

cromatografía SEPHAROSE™ sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofoco, SDS-PAGE y precipitación de sulfato de amonio también se encuentran disponibles, dependiendo del anticuerpo que se vaya a recuperar.

- 5 En una realización, se puede purificar la glucoproteína usando adsorción sobre un sustrato de lecitina (por ejemplo, una columna de afinidad de lecitina) para retirar la glucoproteína que contiene fucosa de la preparación y, de este modo, enriquecer la glucoproteína que no contiene fucosa.

Formulaciones Farmacéuticas

- 10 La invención comprende formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo PD-1 o fragmento de anticuerpo de la invención. Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles, se mezcla el anticuerpo o su fragmento con un vehículo farmacéuticamente aceptable o excipiente, véase, por ejemplo *Remington's Pharmaceutical Services* y *U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Se pueden preparar
15 formulaciones de agentes terapéuticos y diagnósticos por medio de la mezcla con vehículos fisiológicamente aceptables, excipientes, o estabilizantes en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones, soluciones acuosas o suspensiones (véase, por ejemplo, Hardman et al. (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Nueva York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY).

- 25 Se puede determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpos, administradas solas o en combinación con un agente inmunosupresor, por medio de procedimientos analíticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar los valores de DL₅₀ (dosis letal para el 50 % de la población) y DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción entre DL₅₀ y DE₅₀. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivos celulares y estudios con animales se pueden usar
30 para formular un intervalo de dosificación para su uso en humanos. Preferentemente, la dosificación de dichos compuestos se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen el DE₅₀ con escasa o nula toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada.

- 35 Las vías de administración adecuadas incluyen administración parenteral, tal como intramuscular, intravenosa o administración subcutánea y administración oral. La administración del anticuerpo usado en la composición farmacéutica o para la práctica del método de la presente invención se puede realizar en diversas formas convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, aplicación tópica o cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, intraarterial o inyección intravenosa. En una realización, el compuesto de unión de la invención se
40 administra por vía intravenosa. En otra realización, el compuesto de unión de la invención se administra por vía subcutánea.

- 45 Como alternativa, es posible administrar el anticuerpo de forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, por medio de inyección del anticuerpo directamente en el sitio de acción, con frecuencia en una formulación de liberación prolongada o retardada. Además, se puede administrar el anticuerpo en un sistema de entrega de fármaco dirigido.

- 50 Se encuentran disponibles directrices para la elección apropiada de las dosis de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas (véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd., Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344: 783-792; Beniaminovitz et al. (2000) *New Eng. J. Med.* 342: 613-619; Gosh et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 24-32; Lipsky et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343: 1594-1602).

- 55 La determinación de la dosis apropiada se realiza por parte del médico, por ejemplo, usando parámetros o factores conocidos o presuntamente conocidos en la técnica que influyen en el tratamiento o que se predice que influyen en el tratamiento. De manera general, la dosis comienza con una cantidad bastante menor que la dosis óptima y se aumenta por medio de pequeños incrementos posteriormente hasta lograr el efecto deseado u óptimo con o sin ningún efecto secundario negativo. Las mediciones diagnósticas importantes incluyen las de síntomas de, por
60 ejemplo, inflamación o nivel de citocinas inflamatorias producidas.

- Se pueden proporcionar los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y citocinas por medio de infusión continua, o por medio de dosis a intervalos de, por ejemplo, una semana, o 1-7 veces por semana. Las dosis se pueden proporcionar por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, cutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral, intraespinal o por medio de inhalación. Un protocolo preferido es el que implica la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios no deseados. Generalmente, la dosis semanal es de al menos

0,05 µg/kg de peso corporal, más generalmente de al menos 0,2 µg/kg, mucho más generalmente de 0,5 µg/kg, normalmente de al menos 1 µg/kg, más normalmente de al menos 10 µg/kg, mucho más normalmente de al menos 100 µg/kg, preferentemente de al menos 0,2 mg/kg, más preferentemente de al menos 1,0 mg/kg, mucho más preferentemente de al menos 2,0 mg/kg, de manera óptima de al menos 10 mg/kg, de manera más óptima de al menos 25 mg/kg y de manera mucha más óptima de al menos 50 mg/kg (véase, por ejemplo, Yang et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 349: 427-434; Herold et al. (2002) *New Eng. J. Med.* 346: 1692-1698; Liu et al. (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67: 451-456; Portielji et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 133-144). La dosis deseada de una sustancia terapéutica de molécula pequeña, por ejemplo, un péptido mimético, producto natural o sustancia química orgánica, es aproximadamente la misma que para un anticuerpo o polipéptido, sobre la base de moles/kg.

Como se usa en el presente documento, "inhibir" o "tratar" o "tratamiento" incluyen posponer el desarrollo de los síntomas asociados a la enfermedad y/o una reducción de la gravedad de dichos síntomas que se desarrollan, o se espera que se desarrollen, con la citada enfermedad. Los términos además incluyen aliviar los síntomas existentes, evitar síntomas adicionales y aliviar o evitar las causas subyacentes de dichos síntomas. De este modo, los términos indican que se confiere un resultado beneficioso a un sujeto vertebrado con una enfermedad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento del mismo, que cuando se administra solo o en combinación con un agente terapéutico adicional a una célula, tejido o sujeto, resulta eficaz para evitar o aliviar la enfermedad o el trastorno que se trata. Una dosis terapéuticamente eficaz hace referencia a esa cantidad del compuesto suficiente para dar como resultado un alivio de los síntomas, por ejemplo, tratamiento, curación, prevención o alivio del trastorno médico relevante, o un aumento de la tasa de tratamiento, curación, prevención o alivio de dicho trastorno. Cuando se aplica a un principio activo individual administrado solo, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a cantidades combinadas de principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, cuando se administran en combinación, en serie o simultáneamente. Normalmente, una cantidad eficaz de producto terapéutico disminuye los síntomas normalmente en al menos el 10 %; por lo general en al menos el 20 %; preferentemente en al menos el aproximadamente 30 %; más preferentemente en al menos el 40 % y mucho más preferentemente en al menos el 50 %.

Los métodos para la coadministración o tratamiento con un segundo agente terapéutico se conocen bien en la técnica, véase, por ejemplo, Hardman et al. (eds.) (2001) *Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole and Peterson (eds) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA.

La composición farmacéutica de la invención también puede contener otro agente, incluyendo pero sin limitarse a un agente citotóxico, citostático, antiangiogénico o un antimetabolito, un agente dirigido a un tumor, un agente inmunoestimulador o inmunomodulador o un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, citostático u otro agente tóxico. También se puede emplear la composición farmacéutica con otras modalidades terapéuticas tales como cirugía, quimioterapia y radiación.

Los sujetos de investigación, experimentales y veterinarios habituales incluyen monos, perros, gatos, ratas, ratones, conejos, cobayas, caballos y seres humanos.

Usos Terapéuticos para el Anticuerpo y Fragmentos de Anticuerpo de la Invención

El anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno de la invención, que se unen específicamente al PD-1 humano, se pueden usar para aumentar, mejorar, estimular o regular positivamente una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención son particularmente apropiados para tratar sujetos que tienen un trastorno que se puede tratar por medio del aumento de la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que necesitan la potenciación de una respuesta inmunitaria.

Cáncer

El anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno de la invención se pueden usar para tratar el cáncer (es decir, para inhibir el crecimiento o la supervivencia de células tumorales). Los tipos de cáncer preferidos cuya proliferación se puede inhibir usando los anticuerpos de la invención incluyen normalmente los tipos de cáncer que responden a inmunoterapia, pero también los tipos de cáncer que hasta la fecha no se han asociado a inmunoterapia. Los ejemplos no limitantes de tipos de cáncer preferidos para el tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno con metástasis), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata resistente a hormonas), adenocarcinoma de páncreas, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides, glioblastoma, glioma, leucemia, linfoma y otros tumores neoplásicos. Adicionalmente, la invención incluye tumores recurrentes o resistentes cuyo crecimiento se puede inhibir usando los anticuerpos de la invención.

Se pueden usar el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de la invención solos o en combinación con: otros agentes antineoplásicos o agentes inmunogénicos (por ejemplo, células cancerosas atenuadas, antígenos tumorales (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de hidrato de carbono), células que presentan antígenos
 5 tales como células dendríticas pulsadas con antígenos procedentes de tumor o ácidos nucleicos, citocinas inmuno-estimuladoras (por ejemplo, IL-2, IFN α 2, GM-CSF $_$) y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmuno-estimuladoras tales como, pero sin limitarse a, GM-CSF); tratamientos convencionales del cáncer (por ejemplo, quimioterapia, radioterapia o cirugía); u otros anticuerpos (incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos para VEGF, EGFR, Her2/neu, receptores de VEGF, otros receptores de factor de proliferación, CD20, CD40, CTLA-4,
 10 OX-40, 4-1BB e ICOS).

Enfermedades Infecciosas

También se puede usar el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo de la invención para prevenir o tratar
 15 infecciones y una enfermedad infecciosa. Se pueden usar el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo solos, o en combinación con vacunas, para estimular la respuesta inmunitaria frente a patógenos, toxinas y autoantígenos. Se pueden usar los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos para estimular la respuesta inmunitaria frente a infecciones víricas en seres humanos, tales como, pero sin limitarse a, virus de inmunodeficiencia humana, virus de hepatitis de clase A, B y C, virus de Eppstein Barr, citomegalovirus humano,
 20 virus del papiloma humano, virus del herpes. Se pueden usar los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos para estimular la respuesta inmunitaria frente a la infección con bacterias o parásitos fúngicos y otros patógenos.

Coadyuvante de Vacunación

25 Se pueden usar el fragmento o los fragmentos de anticuerpo de la invención junto con otras proteínas recombinantes y/o péptidos (tales como antígenos tumorales o células cancerosas) con el fin de aumentar la respuesta inmunitaria frente a estas proteínas (es decir, en un protocolo de vacunación).

30 Por ejemplo, se pueden usar los anticuerpos anti-PD-1 y sus fragmentos de anticuerpo para estimular las respuestas inmunológicas específicas de antígeno por medio de la coadministración de un anticuerpo anti-PD-1 con un antígeno de interés (por ejemplo, una vacuna). Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un método para mejorar una respuesta inmunitaria frente a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) el antígeno; y (ii) un anticuerpo anti-PD-1 de la invención o una de sus partes de unión a antígeno, de manera que se
 35 mejore la respuesta inmunitaria frente al antígeno en el sujeto. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano o un antígeno procedente de un patógeno. Ejemplos no limitantes de dichos antígenos incluyen, sin limitación, antígenos tumorales o antígenos procedentes de virus, bacterias u otros patógenos.

40 *Enfermedades mediadas por Th2*

También se pueden usar los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de anticuerpo que se describen en el presente documento para tratar enfermedades mediadas por Th2, tales como el asma y la alergia. Esto se basa en el descubrimiento de que los anticuerpos de la invención pueden contribuir a inducir una respuesta Th1. De este modo,
 45 los anticuerpos de la invención se pueden usar en enfermedades mediadas por Th2 para generar una respuesta inmunitaria más equilibrada.

Activación Ex-Vivo de Linfocitos T

50 También se pueden usar los anticuerpos y los fragmentos de antígeno de la invención para la activación ex vivo y la expansión de linfocitos T específicas de antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a receptores con el fin de aumentar los linfocitos T específicas de antígeno contra el tumor. También se pueden usar estos métodos para activar las respuestas de los linfocitos T frente a agentes infecciosos tales como CMV. Cabe esperar que la activación ex vivo en presencia de anticuerpos anti-PD-1 aumente la frecuencia y la actividad de los linfocitos T
 55 transferidas de forma adoptiva.

Otras Terapias de Combinación

60 Como se ha descrito previamente, se pueden coadministrar los anticuerpos anti-PD-1 con uno u otro de más agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. Se puede ligar el anticuerpo al agente (como inmunocomplejo) o se puede administrar por separado del agente. En el último caso (administración por separado), se puede administrar el anticuerpo antes, después o de manera simultánea con el agente y se puede coadministrar con otras terapias conocidas.

65 También se pueden usar los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno para aumentar la eficacia de los linfocitos T específicos de tumor injertados de donante.

Usos No Terapéuticos del Anticuerpo y los Fragmentos de Anticuerpo de la Invención

5 Ya existe un mercado de anticuerpos anti-PD-1 para sus usos no terapéuticos, como queda demostrado por medio de las ventas comerciales de los anticuerpos anti-hPD-1 monoclonales J116 y J105, comercializados por eBioscience de San Diego, California, EE.UU., para su uso en el análisis por citometría de flujo, inmunohistoquímica y ensayos funcionales *in vitro*; y mab1086, un anticuerpo anti-hPD-1 monoclonal comercializado por R&D Systems de Minneapolis, MN, EE.UU., para su uso en citometría de flujo, inmunotransferencia y ELISA. Se pueden usar los anticuerpos descritos en el presente documento con cualquier finalidad no terapéutica proporcionada ahora por
10 J116, J105 y/o Mab1086.

Se puede usar el anticuerpo de la invención como agente de purificación de afinidad.

15 El anticuerpo de la invención también puede ser útil en ensayos diagnósticos, por ejemplo, para detectar la expresión de PD-1 en células específicas, tejidos o suero. Con fines diagnósticos, normalmente se marcará el anticuerpo (ya sea de forma directa o indirecta) con un resto detectable. Numerosos marcadores se encuentran disponibles y se pueden agrupar de forma general en las siguientes categorías: biotina, fluorocromos, radionucleótidos, enzimas, yodo y marcadores biosintéticos.

20 Se puede emplear el anticuerpo de la presente invención en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos sandwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies. A Manual of Techniques*, págs. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

25 También se puede usar el anticuerpo para ensayos diagnósticos *in vivo*. Generalmente, se marca el anticuerpo con un radionúclido (tal como, ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ⁰C, ³¹I, ¹²⁵I, ³H, ³²P, ³⁵S o ¹⁸F) de manera que el antígeno o las células que lo expresan se puedan localizar usando inmunoescintigrafía o tomografía con emisión de positrones.

Depósito de Materiales

30 Se han depositado construcciones de ADN que codifican las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 en el American Type Culture Collection Patent Depository (18801 University Blvd., Manassas, VA). Se depositó el plásmido que contenía ADN que codificaba la cadena pesada de h409A-11, h409A-16 y h409A-17, el 9 de junio de 2008 y se identificó como 081469_SPD-H. Se depositó el plásmido que contenía ADN que codificaba la cadena ligera de h409A11 el 9 de junio de 2008 y se identificó como
35 0801470_SPD-L-11. Se depositó el plásmido que contenía ADN que codificaba la cadena ligera de h409A16 el 9 de junio de 2008 y se identificó como 0801471_SPD-L-16. Se depositó el plásmido que contenía ADN que codificaba la cadena ligera de h409A17 el 9 de junio de 2008 y se identificó como 0801472_SPD-L-17. Se prepararon los plásmidos en las condiciones del Tratado de Budapest acerca del Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines del Procedimiento de Patentes y las Regulaciones a tenor del mismo (Tratado de Budapest).
40

Se considera que la memoria descriptiva escrita anteriormente es suficiente para permitir al experto en la materia la práctica de la invención. La presente invención no se encuentra limitada en su alcance por el cultivo depositado, ya la realización depositada tiene por objeto ser una sola ilustración de un aspecto de la invención y cualquier cultivo
45 que sea funcionalmente equivalente se encuentra dentro del alcance de la presente invención. El depósito de material del presente documento no constituye la admisión de que la descripción escrita en el presente documento sea inadecuada para permitir la práctica de cualquiera aspecto de la invención, incluyendo su mejor modo, ni debe interpretarse como limitante del alcance de las reivindicaciones para la ilustración específica que representa. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento
50 resultarán evidentes para el experto en la materia a partir de la descripción anterior y se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

55 Ejemplo 1: Inmunización y Selección de Anticuerpos anti-PD-1

Inmunización de Ratones con ADNc de hPD-1

60 Para generar los anticuerpos contra el receptor PD-1 humano ("hPD-1"), se obtuvo un ADNc que codificaba el sistema de lectura abierto del receptor hPD-1 por medio de PCR y se subclonó para dar lugar al vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad; CA). A continuación, las células CHO-K1 se transfectaron de forma satisfactoria con hPD-1 y se controló la expresión usando citometría de flujo. Se aislaron los clones CHO-K1 que expresaban PD-1 humano sobre sus membranas y se nombraron como CHO-hPD1.

65 Se inmunizaron ratones por medio de inmunización con cañón de genes usando un cañón de genes Helios (BioRad) y balas de oro revestidas con ADN (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se revistieron

partículas de oro de 1 µm con ADNc de hPD-1 (clonado para dar pcDNA3.1) y, cuando se indicó, vectores de expresión comerciales para Flt3L de ratón y GM-CSF de ratón en una proporción de 2:1:1 (ambos de Aldevron, Fargo, ND). Se usó un total de 1 µg de ADN de plásmido para revestir 500 µg de balas de oro.

- 5 Específicamente, se inmunizaron ratones BALB/C hembras de 7-8 semanas de edad, en la oreja, por medio de un cañón de genes recibiendo 2, 3 o 4 ciclos de un disparo sobre ambas orejas (véase la Tabla I). Un ratón recibió un refuerzo final con 5×10^6 células de CHO-hPD1 en la cavidad peritoneal. Aproximadamente, se detectaron se detectaron títulos de 1:1000 de anti-PD-1 en suero de ratón tras dos inmunizaciones con ADN por medio de ELISA celular usando CHO-PD-1 frente a células parentales CHO-K1. Cuatro días después de la inmunización final, se sacrificaron los ratones y se prepararon poblaciones de células esplénicas desprovistas de eritrocitos como se ha descrito anteriormente (Steenbakkers et al., 1992, *J. Immunol. Meth.* 152: 69-77; Steenbakkers et al., 1994, *Mol. Biol. Rep.* 19: 125-134) y se congelaron a -140 °C.

Tabla I: Programa de inmunización usado para inducir títulos de anticuerpo específico de hPD-1 en ratones Balb/c

	Semana 1	Semana 4	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11
Ratón 730	2 disparos hPD1 pCDNA3.1	2 disparos hPD1 pCDNA3.1		2 disparos hPD1 pCDNA3.1	recogida de células esplénicas		
Ratón 731	2 disparos hPD1 pCDNA3.1	2 disparos hPD1 pCDNA3.1			5 millones de CHO-hPD1	recogida de células esplénicas	
Ratón 738	2 disparos hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + mGM-CSF)	2 disparos hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + mGM-CSF)	2 disparos hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + mGM-CSF)			2 disparos hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + mGM-CSF)	recogida de células esplénicas

15

Selección de Células B que Producen Anticuerpos Anti-PD-1

Para seleccionar clones de células B que producían anticuerpos anti-PD-1 humanos, se agruparon 2×10^7 células esplénicas desprovistas de eritrocitos de ratones inmunizados con ADN de hPD-1, es decir, ratones 730, 731 y 738 (véase la Tabla I), para un cultivo de células B. Se incubaron las células esplénicas en DMEM/medio de HAM F12/10 % de suero de ternera (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.) durante una hora a 37 °C en un matraz de cultivo de plástico para retirar los monocitos. Se sometieron las células no adherentes a un ciclo de selección negativa sobre células CHO-K1, seguido de selección positiva sobre células CHO-hPD1. Se llevaron a cabo ambos procedimientos durante una hora a 37 °C sobre cultivos de crecimiento simultáneo en placas de Petri de 21 cm² o matraces de cultivo T25 (se irradiaron los cultivos celulares antes de su uso, hasta una dosis total de 2000 RAD). Tras la selección positiva, se retiraron las células no ligadas por medio de lavado diez veces con PBS complementado con el 0,132 % de CaCl₂ · 2H₂O y el 0,1 % de MgCl₂ · 6 H₂O. En última instancia, se recogieron las células B ligadas por medio de tratamiento con tripsina.

30 Se sometieron a cultivo las células B seleccionadas y se immortalizaron como se describe en Steenbakkers et al., 1994, *Mol. Biol. Rep.* 19: 125-134. Brevemente, se mezclaron las células B con el 7,5 % (v/v) de sobrenadante de linfocitos T y 50.000 células de Sertoli EL-4 B5 irradiadas (2.500 RAD) en un volumen final de 200 µl de DMEM/medio de HAM F12/10 % de suero de ternera bovino, en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos. El día ocho, se inspeccionó la reactividad anti-PD-1 de los sobrenadantes por medio de ELISA con células CHO-hPD-1 usando el siguiente procedimiento. Se sometieron a cultivo células CHO-K1 y CHO-hPD1 hasta confluencia en las placas de 96 pocillos de fondo plano en 50 µl de DMEM/medio de HAM F12, el 10 % de FBS. A continuación, se añadieron 50 µl de sobrenadante que contenía inmunoglobina durante 1 hora a 37 °C. Después de tres lavados con PBS-Tween, se añadieron 100 µl de peroxidasa de rábano rústico-anti ratón-cabra (dilución 1:1000) (HRP, Southern, Birmingham, AL, EE.UU.) en DMEM/medio de HAM F12/10 % de FBS, durante 1 hora a 37 °C. Tras tres lavados con PBS-Tween, se visualizaron inmunoglobulinas inmovilizadas con UPO/TMB (Biomerieux, Boxtel, Países Bajos).

A partir de este cultivo de células B, se identificaron 13 sobrenadantes reactivos de hPD-1 y se comprobó que inhibían la activación de linfocitos T de Jurkat cuando se inmovilizaron sobre plástico y se immortalizaron clones de células B de pocillos positivos por medio de minielectro fusión siguiendo los procedimientos publicados (Steenbakkers et al., 1992, *J. Immunol. Meth.* 152: 69-77; Steenbakkers et al., 1994, *Mol. Biol. Rep.* 19: 125-134). Específicamente, se mezclaron células B con 10^6 células de mieloma NS-1 y se retiró el suero por medio de lavado con DMEM/medio de HAM F12. A continuación, se trataron las células con solución de pronasa durante tres minutos y posteriormente se lavó con un medio de fusión. Se realizó la electro fusión en una cámara de fusión de 50 µl por medio de un campo eléctrico alterno de 30 s, 2 MHz, 400 V/cm seguido de un pulso de campo elevado, cuadrado de 10 µs, 3 kV/cm y de nuevo un campo eléctrico alterno de 3 s, 2 MHz, 400 V/cm. En última instancia, se transfirió el contenido de la cámara de fusión hasta un medio de selección de hibridoma y se colocó en una placa de 96 pocillos en condiciones limitantes de dilución. En el día 14 tras la fusión, se examinaron los cultivos para determinar el crecimiento de hibridoma y se evaluó la presencia de reactividad de anticuerpos hasta hPD-1. Este procedimiento

50

5 dio como resultado cinco hibridomas anti-hPD-1 diferentes, denominados hPD-1,05A, hPD-1,06B, hPD-1,08A, hPD-1,09A y hPD-1,13A, que se subclonaron por medio de dilución limitante para salvaguardar su integridad y se sometieron a cultivo adicional para producir anticuerpos. Los sobrenadantes obtenidos a partir de estos hibridomas inhibieron intensamente la producción de IL-2 a partir de células Jurkat E6.2.11 tras la estimulación anti-CD3/anti-CD28 (véase la Figura 1 y el texto a continuación).

10 Se subclonaron células de Jurkat E6.1 (American Type Culture Collection) por medio de dilución limitante usando una metodología convencional y los subclones se sometieron para determinar capacidad potenciada para producir IL-2 tras la reticulación de CD3 y CD28. Se obtuvo un subclón que produjo una elevada cantidad de IL-2 y posteriormente se denominó Jurkat E6.2.11 y se usó en los ensayos adicionales. Se revistieron placas de ensayo de 96 pocillos de Costar 3370 durante la noche a 4 °C con 5 µg/ml de Ig anti-ratón de oveja (SAM). Se retiró el exceso de SAM y se bloquearon las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con 200 µl/pocillo de PBS/10 % de suero bovino fetal. Tras tres lavados con PBS, se revistieron los pocillos con 100 µl/pocillo de anti-CD3 (OKT3; 10 o 60 ng/ml) durante 1 hora a 37 °C. Tras tres lavados con PBS, se añadieron 50 µl/pocillo de suero bovino fetal y se añadieron 50 µl/pocillo de células B o de sobrenadante de hibridoma durante 30 minutos a 37 °C. 15 Tras tres lavados con PBS, se añadieron 120 µl/pocillo de suspensión de células, células de Jurkat E6.2.11 (2 x 10⁵ células/pocillo + 0,5 µg/ml de anti-CD28 (Sanguin n.º M1650, Central Laboratory for Bloodtransfusion, Amsterdam, NL) en DMEM/F12/10 % de suero bovino fetal). Tras un cultivo de 6 h, se examinó el sobrenadante para determinar la producción de IL-2 usando ELISA sandwich convencional con una captura de anti-hIL-2 y pares de anticuerpos de 20 detección biotinilados de Pharmingen y Peroxidasa de Rábano Rusticano-Estreptavidina (Southern Biotech) como reactivo de detección. Para determinar la potencia de estos anticuerpos en comparación con PD-L1, se produjo un pequeño grupo de mAb a una escala mayor. Se purificaron los mAb usando cromatografía de afinidad de Proteína G (véase Ejemplo 2). Se revistieron anticuerpos purificados, hPD-L1/Fc (híbrido B7-H1/Fc humano recombinante, R&D systems) o IgG1 kappa de ratón (de Sigma) como control negativo en concentraciones idénticas sobre placas con 25 anti-CD3 como se ha descrito anteriormente. Se añadieron células Jurkat E6.2.11 y anti-CD-28 durante seis horas y se midió la activación de los linfocitos T por medio de la IL-2 producida en el sobrenadante. Dos de los anticuerpos (hPD1.08A y hPD1.09A) mostraron una inhibición 8-10 veces más potente en comparación con PD-L1/Fc inmovilizado.

30 **Ejemplo 2: Purificación y caracterización de anticuerpos anti-PD-1 murinos**

Estabilización de hibridomas que producen anti-PD-1 y purificación de anticuerpos anti-PD-1

35 Se obtuvieron poblaciones de células clonales para cada uno de los hibridomas sometiéndolos a rondas múltiples (> 4) de dilución limitante. Posteriormente, se sometieron a cultivo las células de hibridoma estables en condiciones libres de suero usando biorreactores CELLline (Integra-biosciences) durante seis a ocho días. Se sembraron las células en la cámara interna en un medio sin suero a una densidad de 3 x 10⁶ c/ml en 15 ml y se expandieron hasta aproximadamente 4 x 10⁷ c/ml durante ocho días. Se llenó la cámara externa con medio complementado con hasta el 10 % de BCS (suero de ternera bovino). En el día seis a ocho, se recogió el cultivo de la cámara interna, se lavó 40 con 15 ml de medio de SF y se re-inoculó con células de hibridoma. Se combinaron el sobrenadante del biorreactor y el lavado y se clarificó por medio de centrifugación. Se filtró el sobrenadante resultante a través de una membrana filtrante de 0,22 µm. Para la purificación de anticuerpos, se diluyeron los sobrenadantes 1:1 en un tampón de unión de alto contenido de sal (Glicina 1 M/NaCl 2 M, pH 9,0) y se purificaron los mAb usando una columna de Proteína G HiTrap 5 ml (GE healthcare). Tras el lavado con PBS, se eluyeron los anticuerpos usando Glicina 0,1 M pH = 2,7, 45 seguido de neutralización de pH usando Tris 3 M. En última instancia, se sometió el tampón a intercambio de PBS usando columna de filtración de gel PD-10 (GE healthcare) y se concentraron los anticuerpos usando concentradores centrifugos Ultra-15 (Amicon) y se cuantificó usando espectrofotometría.

Anticuerpos Comerciales

50 Se usaron los siguientes anticuerpos comerciales en diversos estudios descritos en el presente documento: se adquirió el clon de anticuerpo Anti-PD-1 J116 (N.º 14-9989) en eBioscience. Se adquirió el clon anti-CTLA-4 14D3 (mAb 16-1529) en eBioscience. Se adquirió el clon Anti-PD-1 192106 (mAb1086) en R&D systems (N.º mAb1086). Se adquirió el clon MOPC21, kappa, de anticuerpo de control de isotipo mIgG1 en Sigma (N.º M9269). Se 55 adquirieron los controles de isotipo mIgG1 kappa (mAb 16-4714) y IgG2a kappa (mAb 16-4724) en eBioscience.

Análisis de Unión

60 Se usaron experimentos de ELISA basados en células ("CELISA") y basados en proteínas para determinar las afinidades de unión aparentes (presentadas como valores de CE50). En algunos casos, se comparó la unión de los anticuerpos comerciales anti-PD-1 con la de los anticuerpos PD-1 J116 (eBiosciences) y Mab1086 (R&D systems).

65 Se usó ELISA de proteínas para la determinación de la unión relativa de los anticuerpos a PD-1/Fc humano. Se inmovilizó hPD-1/Fc (R&D Systems) sobre placas de 96 pocillos de Maxisorp (Nunc) por medio de incubación durante 4 h a temperatura ambiente (o durante la noche a 4 °C). Se bloquearon los sitios de unión específicos por medio de incubación con el 3 % de BSA en PBST durante una hora a temperatura ambiente. Tras el recubrimiento,

se lavaron las placas tres veces con PBST. Se prepararon diluciones de anticuerpos anti-PD-1 en tampón de unión (PBS que contenía el 0,1 % de Tween 20 y el 0,3 % de BSA) y se incubaron con proteína de fusión inmovilizada durante una hora a 25 °C. Tras la unión, se lavaron las placas tres veces con PBST, se incubaron durante una hora a 25 °C con IgG anti-ratón de cabra marcada con peroxidasa (Southern Biotech) diluida 1/4.000 en tampón de unión, se lavó de nuevo y se desarrolló usando TMB. La Figura 2 muestra los resultados de ELISA. Se presenta la concentración de unión a mitad del máximo como una medición de la afinidad de unión relativa (Tabla II).

También se evaluó la unión a células CHO-PD-1 por medio de CELISA. Para CELISA, se cultivaron células CHO-hPD-1 hasta 80 a 100 por ciento de confluencia en un 50 µl de medio de cultivo (DMEM/medio de HAM F12, el 10 % de PBS). A continuación, se añadieron 50 µl de medio que contenía diversas concentraciones de mAb purificado durante una hora a 37 °C. Tras tres lavados con PBS-Tween, se añadieron 100 µl de HRP-anti-ratón-cabra (Southern Biotech N.º 1030-05) (diluido 1:1000 en medio de cultivo) durante una hora a 37 °C. Tras tres lavados adicionales con PBS-Tween, se visualizaron inmunoglobulinas inmovilizadas con sustrato de peroxidasa colorimétrico TMB (BD Biosciences). Se midió el aumento de absorbancia debido a la actividad de peroxidasa (450 nm) en un lector de placas de microtitulación. La Figura 2 muestra la relación dosis-respuesta entre la concentración y la unión para los anticuerpos hPD-1.08A y hPD-1.09A. La Tabla II recoge los resultados de los estudios de unión de proteínas y células.

Análisis cinético por medio de interferometría de bio-luz (ForteBio)

Para caracterizar de manera adicional las características de unión de los anticuerpos, se estableció el perfil de cada uno usando interferometría de bio-luz sobre el sistema Octet (ForteBio, Menlo Park, CA) para dilucidar las cinéticas de unión y calcular las constantes de unión de equilibrio. Se realizó este ensayo por medio de acoplamiento de una proteína de fusión PD-1-Fc (R&D Systems) a biosensores reactivos con amina (ForteBio) usando química de aminas convencional. Posteriormente, se observó la unión del mAb anti-PD-1 y la disociación de los biosensores a diversas concentraciones de anticuerpo. Específicamente, se pre-humedecieron los biosensores reactivos con amina sumergiéndolos en pocillos que contenían MES 0,1 M pH 0 5,5 durante 5 minutos. A continuación, se activaron los biosensores usando una mezcla NHS 0,1 M/EDC 0,4 M durante 5 minutos. Se acopló la proteína de fusión PD1-/Fc (R&D Systems) sumergiendo los biosensores en una solución de 12 µg/ml de PD-1/Fc en MES 0,1 M durante 7,5 minutos. Se inactivó la superficie del biosensor usando una solución 1 M de etanolamina durante 5 minutos. Se equilibraron los biosensores en PBS durante 5 minutos. Se observó la asociación del mAb anti-PD-1 colocando los biosensores en pocillos que contenían diversas concentraciones de anticuerpo (anticuerpo purificado 10-80 nM > el 99 % por SDS-PAGE en PBS) y controlando la interferometría durante 30 minutos. Se midió la disociación tras la transferencia de los biosensores al interior de PBS y se controló la señal de interferometría durante 60 minutos. Se ajustaron las tasas de activación y desactivación (k_{obs} y k_d) usando un modelo de ajuste global de unión 1:1 que comprendía todas las concentraciones sometidas a ensayo y se calculó la constante K_D de unión de equilibrio. La Tabla II y la Figura 6 siguientes presentan los resultados de los estudios cinéticos.

Tabla II: Resumen de caracterización bioquímica de mAb anti-PD-1 murinos

mAb	Análisis de Unión		Bloqueo de Ligando			Análisis Cinético		
	ELISA	CELISA	FACS	FMAT		ForteBio Octet		
	CE50 (pM)	CE50 (pM)	CI50 (pM)	CI50 (pM)		k_{asoc}	k_{disoc}	K_D
	hPD-1/Fc	hPD-1/CHO	PD-L1	PD-L1	PD-L2	1/s	1/MS	M
05A	338		15			1,62E+05	1,11E-04	6,90E-10
068	135		160			8,32E+04	9,74E-05	1,17E-09
08A	76	79	0,9	0,73	2,1	1,25E+06	3,03E-05	2,41E-11
09A	123	113	0,8	0,90	1,7	1,64E+06	3,60E-05	2,20E-11
13A	485		64			1,46E+05	4,16E-04	2,85E-09
J116	410	349	106	> 100	44	8,24E+04	1,50E-04	1,82E-09
mAb1086	59	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000	2,45E+05	1,68E-04	6,86E-10

Se sometieron a ensayo dos anticuerpos monoclonales, hPD-1.08A y hPD-1.09A, unidos considerablemente más fuertemente que cualquier otro mAb usando este ensayo, con una K_D determinada de 24 a 22 pM para hPD-1.08A y hPD-1.09A, respectivamente. En comparación con los otros anticuerpos anti-PD-1 sometidos a ensayo, la mayor afinidad se debe a una menor velocidad de disociación y a una velocidad de asociación significativamente más rápida medida para hPD-1.08A y hPD-1.09A.

Bloqueo de Ligando

Se estudió el bloqueo de la unión de ligando usando citometría de flujo. Se disociaron células CHO que expresaban PD-1 humano a partir de matraces de cultivo adherentes y se mezclaron con concentraciones variables de anticuerpo anti-PD-1 y una concentración constante (600 ng/ml) de hPD-L1/Fc no marcado o proteína de fusión PD-L2/Fc humana recombinante (ambos de R&D Systems) en una placa de 96 pocillos. Se equilibró la mezcla durante 30 minutos sobre hielo, se lavó tres veces con tampón FACS (PBS que contenía el 1 % de BCS y el 0,1 % de azida

de sodio) y se incubó con Fc anti-humano de cabra marcado con FITC durante 15 minutos adicionales sobre hielo. Se lavaron de nuevo las células con tampón FACS y se analizaron por medio de citometría de flujo. Se analizaron los datos con Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) usando regresión no lineal y se calcularon los valores de CI_{50} .

5 La Tabla II recoge los datos de CI_{50} resumidos. Se determinaron los anticuerpos 05A, 06B y 13A para demostrar una K_D entre 600 pM y 3 nM para la unión de hPD-1. A pesar de la unión intensa, cada uno de estos anticuerpos demostró $CI_{50} > 10$ nM para el bloqueo de la unión hPD-L1 a hPD-1. El anticuerpo J116 anti-PD-1 disponible en el mercado (eBiosciences) compitió de forma débil con PD-L1 para determinar la unión, presentando un valor de CI_{50} calculado fuera del intervalo de este experimento (> 100 nM). El IgG1 de ratón de control no compite con PD-L1 por la unión a PD-1. Por el contrario, los anticuerpos de elevada afinidad hPD-1.08A y hPD-1.09A inhibieron la unión de PD-L1 con valores de CI_{50} por debajo de 1 nM, mientras que la unión de PD-L2 se bloqueó con valores de CI_{50} de alrededor de 1-2 nM (Tabla II). Se notificó que PD-L2 se unía de forma preliminar a PD-1 con una afinidad de dos a seis veces mayor que en el caso de PD-L1 (Youngnak P. et al., 2003, Biochem. Biophys. Res. Commun. 307, 672-15 677).

Se confirmó el bloqueo de ligando usando un ensayo de competición homogéneo y mediante la detección usando tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico (FMAT). En resumen, se disociaron CHO.hPD-1 de los matraces de cultivo adherentes, se mezclaron con concentraciones variables de anticuerpo anti-PD-1 y una concentración constante (600 ng/ml) de proteína de fusión hPD-L1/Fc o hPD-L2/Fc (ambas de R&D Systems), marcada con un colorante fluorescente (AlexaFluor 647, Invitrogen) en una placa de 96 pocillos. Se equilibró la mezcla durante 90 minutos a 37 °C y se leyó usando un Analizador de Detección Celular AB8200 (Applied Biosystems), Foster, City, CA). Se analizaron los datos con Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) usando regresión no lineal y se calcularon los valores de CI_{50} . La Figura 3 muestra los resultados de un experimento de dosis-respuesta que indica que la magnitud del bloqueo de ligando se determina por medio de la concentración de anticuerpo. Se puede inhibir completamente la unión tanto de hPD-L1/Fc como de hPD-L2/Fc a las células CHO-hPD-1 por hPD-1.08A, hPD-1.09A y (en menor medida) por 1116 de manera dependiente de la dosis. La Tabla II resume los datos de CI_{50} calculados. Confirmando los resultados obtenidos usando citometría de flujo, los anticuerpos de elevada afinidad hPD-1.08A y hPD-1.09A inhibieron la unión de PD-L1 con valores de CI_{50} por debajo de 1 nM.

Reactividad Cruzada de Especies

Para evaluar la reactividad cruzada de las especies de los anticuerpos, se clonaron receptores PD-1 de macaco de Java y de ratón por medio de PCR y se generaron células de CHO-K1 sometidas a transfección de forma estable. Se sometieron a ensayo los anticuerpos para determinar la unión al receptor de macaco de Java usando CELISA. Se comprobó que los anticuerpos comerciales J116, hPD-1.08A y hPD-1.09A se unían con igual afinidad a PD-1 humano y de macaco de Java y bloqueaban la unión de hPD-L1/Fc y hPD-L2/Fc al PD-1 de macaco de Java con similar eficacia en comparación con el PD-1 humano. Esto no resulta sorprendente ya que se comprobó que la secuencia de aminoácidos de la parte extracelular del PD-1 de macaco de Java era en un 97 % idéntica a la del PD-1 humano. Además del PD-1 de macaco de Java, hPD-1.08A y hPD-1.09A también bloquearon funcionalmente PD-1 procedente de macacos de la India en cultivos celulares de sangre estimulados con SEB descritos en el Ejemplo 3. Ninguno de los anticuerpos sometidos a ensayo se unió a PD-1 de ratón con afinidad detectable en ninguno de los ensayos usados.

45 En resumen, se purificaron y caracterizaron cinco anticuerpos anti-PD-1 monoclonales, que se aislaron basándose en su capacidad para modular la función de Jurkat. Estos anticuerpos se unieron intensamente a PD-1 (con constantes de disociación en el intervalo de 20 pM a 3 nM) y fueron capaces de bloquear la interacción tanto con PD-L1 como PD-L2 con valores variables de CI_{50} . Cuatro de estos mAb anti-hPD-1 se consideraron mejores que los mejores mAb anti-PD-1 disponibles en el mercado. Cada uno de los anticuerpos, cuando se añadieron en disolución actuaron como antagonistas de receptor, potenciando en última instancia las respuestas de linfocitos T (véase Ejemplo 3).

Ejemplo 3: Formación de Perfil Funcional de Anticuerpos Anti-PD-1

Se potencia la respuesta de linfocitos T humanas frente a SEB por medio de hPD-1.08A y hPD-1.09A

Se sometieron a ensayo anticuerpos anti-PD-1 para determinar su capacidad para potenciar la actividad de los linfocitos T *in vitro* usando células sanguíneas procedentes de voluntarios sanos. Un ensayo usado para caracterizar la consecuencia funcional de bloquear el receptor humano PD-1 utilizó enterotoxina B de Staphylococcus (SEB) para unirse y activar todos los linfocitos T que expresaban la cadena de receptor celular $V\beta 3$ y $V\beta 8$. Se obtuvo sangre de donante humano sano y se diluyó 1:10 para dar lugar a un medio de cultivo. Se colocó la sangre diluida en placas (150 μ l por pocillo) de fondo redondo de 96 pocillos y se preincubó durante 30-60 minutos con mAb y concentraciones variables. Posteriormente, se añadió SEB a diferentes concentraciones que variaron de 10 ng/ml a 10 μ g/ml. Se recogieron los sobrenadantes tras 2 a 4 días de cultivo y se cuantificó la cantidad de IL-2 producido usando ELISA (descrito en el Ejemplo 1) o usando tecnología de multiplex convencional (plataforma Luminex -

estuches de detección de citocina Biosource). La valoración de SEB de 100 ng/ml hasta 10 µg/ml estimuló de forma significativa la producción de IL-2 por parte de las células sanguíneas. Normalmente, dependiendo del donante, se detectó de 100 a 1000 µg/ml de IL-2 por medio de ELISA 2-4 días después de la estimulación con 1 µg/ml de SEB. La adición de hPD-1.08A y hPD-1.09A potenció la producción de IL-2 sobre IgG1 de ratón de control, en promedio de 2 a 4 veces a la concentración de anticuerpo más elevada sometida a ensayo (25 µg/ml). Se calculó el valor promedio del índice de estimulación para los experimentos realizados con un conjunto de voluntarios sanos independientes (Figura 4). Estos experimentos demostraron que tanto hPD-1.08A como hPD-1.09A potenciaron la producción de IL-2 tras la estimulación con SEB de células sanguíneas diluidas. Los niveles de expresión tanto de PD-1 como de PD-L1 (pero no de PD-L2) estuvieron regulados positivamente (cuantificados por medio de citometría de flujo) con el tiempo tras la estimulación con SEB de células sanguíneas. El anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (clon MIH5, Ebiosciences N.º 16-5982) y anti-CTLA-4 (clon 14D3, eBiosciences N.º 16-1529) también indujeron un aumento de la producción de IL-2 en condiciones similares, un descubrimiento que posteriormente validó el uso del ensayo de estimulación con SEB para cuantificar la actividad de los linfocitos T tras la manipulación de los mecanismos co-estimuladores (Figura 4). Se descubrió que la producción potenciada de IL-2 por medio de los anticuerpos anti-PD-1 era dependiente de la dosis. Además de IL-2, por medio de la tecnología Luminex, también se descubrió que los niveles de TNF α , IL-17, IL-7, IL-6 e INF γ se modulaban significativamente por medio de hPD-1.08A y hPD-1.09A. Los resultados de estos experimentos indican que hPD-1.08A y hPD-1,09 se pueden usar para estimular las respuestas de los linfocitos T humanas.

Adicionalmente, se sometió a ensayo la capacidad del anticuerpo anti-PD-1, hPD-1.09A para potenciar la actividad de los linfocitos T *in vitro* usando células sanguíneas procedentes de pacientes con cáncer. Se sometió a ensayo la sangre procedente de pacientes con melanoma avanzado (1 paciente) o cáncer de próstata (3 pacientes) siguiendo el protocolo anterior. Los resultados de la cuantificación de citocina se presentan en la Tabla III, como número de veces de aumento de la citocina producida cuando se estimulan las células en presencia de 25 ug/ml de hPD-1.09A en comparación con la estimulación de SEB en ausencia de anticuerpo. En resumen, se comprobó que hPD-1,09A aumenta la producción de IL-2 inducida por SEB de 2 a 3,5 veces para cada uno de los 4 pacientes. Similarmente, se potenció la producción de TNF α , IL-17 y IFN γ y disminuyó la producción de IL-5 e IL-13. Estos experimentos indican que hPD-1.09A tiene la capacidad de estimular las respuestas de los linfocitos T en pacientes con cáncer. Además, estos experimentos sugieren una preferencia hacia las respuestas Th 1.

Tabla III: Producción de citocina estimulada con SEB en presencia de hPD-1.09A

Paciente	Tipo del cáncer	Número de veces de cambio en el nivel de citocina						
		EL-2	TNF α	IFN γ	IL-5	IL-6	IL-13	E-17
A	Próstata	3,4	2,0	1,9	0,7	2,1	0,8	1,8
B	Próstata	2,1	1,5	1,2	0,4	2,2	0,6	2,6
C	Próstata	2,0	2,4	2	0,9	2,4	1,1	2,4
D	Melnoma	2,0	1,9	1,5	0,4	1,9	0,5	2,0

La respuesta de reclutamiento los linfocitos T humanos frente a la prueba TT es potenciada por hPD-1.08A y hPD-1,09

Otro ensayo usado para establecer el perfil del efecto funcional de anticuerpos PD-1 anti-humanos que bloquean la interacción del receptor con sus ligandos naturales usó el antígeno de toxoide tetánico (TT) para estimular los linfocitos T de memoria pre-existentes en sangre de donante sano. Para ello, se colocó PBMC recién preparado (2 x 10⁵ células) en placas de fondo redondo de 96 pocillos en medio RPMI 1640 completo (que contenía el 5 % de suero humano inactivado térmicamente), se pre-incubó con anticuerpos de ensayo a concentración variable y se estimuló con TT (Astarte Biologics) a una concentración de 100 ng/ml. Se incubaron las células durante 3-7 días a 37 °C, 5 % de CO₂ después de lo cual se recogieron los sobrenadantes. Se determinaron las concentraciones de citocina por medio de ELISA (conjuntos de pares de anticuerpos de detección por ELISA IL-1 e IFN- γ de eBioscience) y análisis de multiplex (plataforma Luminex - kits de detección de citocina Biosource). El bloqueo de PD-1 potenció la proliferación y potenció significativamente la producción de citocina (Figura 5) incluyendo IFN γ e IL-2 en comparación con el antígeno solo. El análisis de Luminex reveló que la producción de citocinas GM-CSF, RANTES e IL-6 aumenta tras el bloqueo de PD-1.

Tinción de PD-1 humano sobre células humanas incluidas en parafina y fijadas con formol

Debido a que las células sanguíneas estimuladas con SEB demostraron una expresión potenciada de PD-1 por medio de citometría de flujo, se usaron estas células para determinar si hPD-1.09A podía detectar PD-1 en un tejido incluido en parafina y fijado con formol para su uso histológico. Se estimularon células mononucleares sanguíneas periféricas de donante humano con 0,1 µg/ml de SEB durante 3 días, después de lo cual se recogieron las células no adherentes (principalmente linfocitos), se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron (1100 rpm durante 5 min.). Se fijaron las células durante 10 minutos en formaldehído al 4 %, se incorporó el sedimento celular a agarosa, se deshidrataron las células en etanol (posteriormente al 70 %, 80 %, 96 % y 100 %) y xileno y posteriormente se incluyeron en. Se montaron secciones (4 µm) sobre portaobjetos de vidrio y se hidrataron (xileno, etanol al 100 %, xileno, etanol al 100 %).

96 %, 80 %, 70 %, tampón PBS), después de lo cual se realizó la recuperación de antígeno en el tampón de citrato caliente usando metodología convencional. Se bloqueó la actividad de peroxidasa usando metanol al 100 % que incluía H₂O₂ a 0,3 % y se lavaron los portaobjetos en agua y PBS, Tween al 0,1 %. Se incubaron las secciones con hPD-1.09A durante 1,5 horas a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-Tween, seguido de métodos de detección convencionales. Se contra-tiñeron los portaobjetos con hematotoxina durante 30 segundos a temperatura ambiente, se deshidrataron con xileno y se montaron para el examen microscópico. Estos experimentos mostraron que los linfocitos procedentes de cultivos de PBMC estimulados con SEB se tiñeron intensamente (en comparación con el control de isotipo) con hPD-1.09A, al contrario que los cultivos de PBMC no estimulados, indicando que hPD-1.09A es útil como reactivo de diagnóstico.

Ejemplo 4: Secuencias de Anticuerpo anti-PD-1 y Humanización Posterior

Clonación de ADNc de inmunoglobulina

Usando métodos basados en PCR de cebador degenerado, se determinaron las secuencias de ADN que codificaban las regiones variables de los anticuerpos de ratón expresados por medio de los hibridomas hPD-1.08A y hPD-1.09A. En resumen, se generaron ADNc específicos génicos para cadenas pesadas y ligeras, usando el kit de síntesis de ADNc iScript Select (Biorad N.º 1708896) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores de PCR usados estaban basados en el conjunto Ig-cebador (Novagen N.º 69831-3). Se llevaron a cabo reacciones de PCR degenerados usando Taq polimerasa de acuerdo con el protocolo de conjunto de cebadores de Novagen. Se analizaron los productos de PCR por medio de electroforesis de gel de agarosa. El tamaño de amplicón esperado para ambas regiones variables de cadena ligera y pesada es de aproximadamente 500 pares de bases. Se clonaron dos µl de producto de PCR amplificado con Taq procedente de las reacciones que dieron como resultado una banda apropiada para dar lugar a un vector pCR4 TOPO (Invitrogen N.º K4595-40) y se transformaron en E.coli DH5-alfa según indicó el fabricante. Se evaluaron los clones por medio de PCR de colonias usando cebadores universales M13 directos e inversos y se eligieron de dos a tres clones para cada una de las reacciones para el análisis de secuenciación de ADN.

Se sometieron los clones a secuenciación en ambas direcciones usando cebadores universales M13 directo, M13 inverso, T3 y T7. Se analizaron los resultados de cada reacción de secuenciación para cada clon usando Seqman. Se buscaron secuencias de consenso frente a bases de datos de secuencias de región de línea germinal e Ig Variable reordenada usando NCBI blastocito-Ig (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/ligblast/>). Los resultados de blastocitos para hPD-1.08A identificaron una cadena pesada reordenada de forma productiva (en bloque) sin la introducción de codones de detención. Se identificaron clones de cadenas ligeras que codificaban dos secuencias diferentes; una es una cadena ligera reordenada de forma productiva (en fase) sin la introducción de codones de detención y la otra es una secuencia reordenada de forma no productiva que contiene un cambio de fase que conduce a un codón de detección en la región FR4. La fracción transcrita estéril no productiva observada se origina probablemente a partir del compañero de fusión de mieloma (Carroll W. L. et al., *Mol. Immunol.* 25: 991-995 (1988) y se descartó.

Los resultados de blastocitos para hPD-1.09A identificaron cadenas ligeras y pesadas reordenadas de forma productiva (en fase) sin la introducción de codones de detención. Se confirmaron las secuencias de aminoácido de las proteínas expresadas por medio de espectrometría de masas. Se describen las secuencias en el Listado de Secuencia adjunto y se recogen en la Tabla IV.

Tabla IV: Números de ID de secuencia para los anticuerpos PD-1 anti-humano murinos de la presente invención

SEQ ID NO:	Descripción
1	región variable de cadena pesada hPD-1.08A (ADN)
2	región variable de cadena ligera hPD-1.08A (ADN)
3	región variable de cadena pesada hPD-1.09A (ADN)
4	región variable de cadena ligera hPD-1.09A (ADN)
5	región variable de cadena pesada hPD-1.08A (AA)
6	región variable de cadena ligera hPD-1.08A (AA)
7	región variable de cadena pesada hPD-1.09A (AA)
8	región variable de cadena ligera hPD-1.09A (AA)
9	CDR1 de cadena ligera hPD-1.08A (AA)
10	CDR2 de cadena ligera hPD-1.08A (AA)
11	CDR3 de cadena ligera hPD-1.08A (AA)
12	CDR1 de cadena pesada hPD-1.08A (AA)

13	CDR2 de cadena pesada hPD-1.08A (AA)
14	CDR3 de cadena pesada hPD-1.08A (AA)
15	CDR1 de cadena ligera hPD-1.09A (AA)
16	CDR2 de cadena ligera hPD-1.09A (AA)
17	CDR3 de cadena ligera hPD-1.09A (AA)
18	CDR1 de cadena pesada hPD-1.09A (AA)
19	CDR2 de cadena pesada hPD-1.09A (AA)
20	CDR3 de cadena pesada hPD-1.09A (AA)
21	región variable de cadena pesada 109A-H (ADN)
22	región variable de cadena pesada 109A-H optimizada con codón (ADN)
23	longitud completa de cadena pesada 409A-H optimizada de codón (ADN)
24	región variable de cadena ligera K09A-L-11 (ADN)
25	región variable de cadena ligera K09A-L-16 (ADN)
26	región variable de cadena ligera K09A-L-17 (ADN)
27	región variable de cadena ligera K09A-L-11 optimizada de codón (ADN)
28	región variable de cadena ligera K09A-L-16 optimizada de codón (ADN)
29	región variable de cadena ligera K09A-L-17 optimizada de codón (ADN)
30	región variable de cadena pesada 109A-H (AA)
31	longitud completa de cadena pesada 409A-H (AA)
32	región variable de cadena ligera K09A-L-11 (AA)
33	región variable de cadena ligera K09A-L-16 (AA)
34	región variable de cadena ligera K09A-L-17 (AA)
35	longitud completa de cadena pesada 109A-H (AA)
36	longitud completa de cadena ligera K09A-L-11 (AA)
37	longitud completa de cadena ligera K09A-L-16 (AA)
38	longitud completa de cadena ligera K09A-L-17 (AA)

Se anotan las regiones de armazón y CDR de acuerdo con una Kabat E.A. et al., 1991, *Sequences of proteins of Immunological interest*, en: *NIH Publicaction* N.º 91-3242, US Department of Health and Human Services, Bethesda, MD.

5

Construcción y Expresión de Anticuerpo c109A quimérico

Se construyeron cadenas pesadas y ligeras quiméricas por medio de unión de ADNc clonados con PCR de regiones de VL y VH de PD-1,09A de ratón a regiones constantes IgG1 y kappa humanas, respectivamente. Se modificaron los extremos 5' y 3' de las secuencias de ADNc de ratón usando cebadores de PCR diseñados para añadir una secuencia predominante apropiada a cada cadena y sitios de restricción para permitir la clonación para dar lugar a los vectores de expresión de anticuerpos recombinantes existentes.

10

Se sometieron a electroporación células COS-7 (0,7 ml a 10^7 /ml) con 10 µg cada una de los plásmidos quiméricos de expresión de cadena pesada y ligera. Posteriormente, se cultivaron estas células en 8 ml de medio de proliferación durante tres días. Se usó ELISA sándwich para medir las concentraciones de anticuerpo en los sobrenadantes a partir de las transfecciones de COS-7. Esto mostró que las células COS-7 sometidas a transfección segregaron aproximadamente 295 ng/ml de anticuerpo kappa-IgG1 quimérico en tres transfecciones separadas.

15

Se midió la unión del anticuerpo quimérico producido por medio de las células COS-7 sometidas a transfección usando ELISA de unión de PD-1 y CELISA (véase Ejemplo 2) y se comprobó que se unían a PD-1 con una afinidad comparable a la del anticuerpo murino.

20

Diseño de Anticuerpo Humanizado

25

Se humanizó el anticuerpo hPD-1.09A por medio de MRCT (Cambridge, Reino Unido) usando tecnología de injerto de CDR (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 5.225.539). En resumen, se compararon las secuencias de cadena variables del anticuerpo murino hPD-1.09A con las disponibles en el banco de datos de proteínas Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Se generó un modelo de homología de hPD-1.09A basado en las estructuras VH y VK más próximas. Se identificaron y analizaron las secuencias humanas con la

30

identidad mayor con respecto a hPD-1.09A. (Foote y Winter, *J. Mol. Biol.* 224: 487-499 (1992); Morea V. et al., *Methods* 20: 267-279 (2000); Chothia C. et al., *J. Mol. Biol.* 186: 651-663 (1985). Se identificaron los armazones humanos más apropiados sobre los cuales construir las cadenas pesadas y ligeras injertadas con CDR.

- 5 Para la cadena pesada, se determinó que el armazón codificado por el N.º de acceso al banco de genes AB063829 era el más apropiado. El análisis de la secuencia hPD-1.09A VK muestra que su longitud de CDR1 (15 restos) no se encuentra en ningún VK humano. Por este motivo, se analizaron los armazones de tres longitudes CDR1 diferentes (restos 11, 16 y 17) con el fin de someter a ensayo qué longitud de CDR1 reproduciría el comportamiento de hPD-1.09A VK. Se identificaron las secuencias VK humanas con la mayor identidad a hPD-1.09A VK en los restos seleccionados importantes en la estructura y con longitudes de CDR1 de 11, 16 y 17. Se seleccionó el N.º de acceso al banco de genes M29469 en el que se basó K109A-L-11. Se seleccionó el armazón del N.º de acceso al banco de genes AB064135 en el que se basó K09A-L-16 y se escogió el armazón procedente del N.º de acceso al banco de genes X72431 en el que se basó K09A-L-17.
- 10
- 15 Se llevaron a cabo injertos directos para generar construcciones de expresión para cada cadena. Se describen las secuencias de ADN y de proteínas de 109A-H, K09A-L-11, K09A-L-16 y K09A-L-17 en el Listado de Secuencias adjunto (Tabla IV).
- 20 Se produjo una versión de IgG4 de h109A humanizado, con la mutación de Adair de estabilización (Angal S. et al., *Mol. Immunol.* 30: 105-108 (1993)), en la que se convierte serina 241 (numeración de Kabat) en prolina. Esta secuencia se describe en los SEQ. ID NOS: 23 y 41.

Ejemplo 5: Características de Unión y Propiedades Funcionales de Anticuerpos anti-PD-1 Humanizados

25 Producción y Purificación

- Se produjeron anticuerpos humanizados h409A11, H409A16 y h409A17 por medio de transfección transitoria de células CHO-S. Se cultivaron células en medios CD-CHO (Gibco) y C5467 (Sigma) durante 8 días en matraces de agitación. Se purificaron los anticuerpos a partir de los sobrenadantes de células por medio de cromatografía de Proteína A, se lavaron, se eluyeron usando ácido acético 1 M y se neutralizaron usando Tris 3 M. En última instancia, se intercambió el tampón por ácido acético 100 mM que se había ajustado hasta pH 5,5 con base Tris 1 M.
- 30

Análisis de Unión y Cinético

- 35 Se realizaron ELISA basados en proteína y en células para determinar las afinidades de unión aparentes (presentadas como valores de CE50) como se describe en el Ejemplo 2. Cada uno de los anticuerpos humanizados anti-PD-1 se unió a PD-1/Fc y expresaron celularmente PD-1 con valores de CE50 comparables al anticuerpo parental murino (Tabla V).
- 40 También se realizaron las características de unión cinéticas de los anticuerpos usando interferometría de bio-luz como se describe en el Ejemplo 2 (Figura 6). Dos de los anticuerpos humanizados, h409A11 y h409A16, se unieron considerablemente de manera más fuerte que cualquier otro mAb sometido a ensayo usando esta prueba, con una K_D determinada de 29 y 27 pM para h409A11 y h409A16, respectivamente (Tabla V). En comparación con los otros anticuerpos anti-PD-1 sometidos a ensayo, la mayor afinidad se debe principalmente a una menor velocidad de disociación. De manera similar a los anticuerpos parentales murinos, los anticuerpos anti-PD-1 humanizados h409A11, h409A16 demostraron unión a PD-1 de macaco de Java PD-1 con una K_D determinada de menos de 120 pM.
- 45

Bloqueo de Ligando

- 50 Se midió la capacidad de los anticuerpos humanizados para bloquear la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 usando un ensayo de competición homogéneo y una detección usando un ensayo de competición de FMAT como se describe en el Ejemplo 2.
- 55 La unión tanto de hPD-L1/Fc y hPD-L2/Fc a células CHO-hPD-1 se puede inhibir completamente de forma dependiente de la dosis por medio de cualesquiera anticuerpos humanizados sometidos a ensayo. Los datos de CI_{50} calculados se resumen en la Tabla V. Similarmente al anticuerpo hPD-1.09A murino parental, cada uno de los mAb humanizados, h409A11, h409A16 y h409A17 inhibieron la unión de hPD-L1 y PD-L2 con valores de CI_{50} por debajo de 1 nM. De manera similar a los anticuerpos parentales murinos, los anticuerpos anti-PD-1 humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 demostraron inhibición de la unión de ligandos a PD-1 de macaco de Java con valores de CI_{50} calculados inferiores a aproximadamente 1 nM.
- 60

Tabla V: Características de unión de los anticuerpos humanizados anti-hPD-1 de la invención

mAb	Análisis de Unión		Bloqueo de Ligando		Análisis Cinético		
	ELISA	CELISA	FMAT		Fortebio Octet		
	CE50 (pM)	CE50 (pM)	CI50 (pM)		K _{asoc}	K _{disoc}	K _D
	hPD-1/Fc	hPD-1/CHO	PD-L1	PD-L2	1/s	1/Ms	M
h409A11	76	62	625	695	1,04E+06	3,05E-05	2,93E-11
h409A16	90	63	696	810	9,97E+05	2,72E-05	2,73E-11
h409A17	88	83	818	463	1,00E+06	1,91E-04	1,91E-10

La Respuesta de Linfocitos T Humanas frente a SEB es potenciada por mAb Humanizados

5 Se sometió a ensayo la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 humanizados para potenciar la actividad de los linfocitos T in vitro usando células sanguíneas procedentes de voluntarios sanos como se describe en el Ejemplo 3. Se recogieron los sobrenadantes después de 4 días de cultivo y se cuantificó la cantidad de IL-2 producido usando ELISA. Los anticuerpos PD-1 humanizados demostraron la capacidad de aumentar la producción de IL-2 estimulada por SEB (Figura 7). Adicionalmente, los anticuerpos anti-PD-1 humanizados aumentaron la producción de IL-2
 10 inducida por SEB en sangre de pacientes con cáncer, de forma similar a como se describe en el Ejemplo 3.

En resumen, los mAb humanizados h409A11, h409A16 y h409A17 conservaron toda la actividad funcional durante el proceso de humanización. Los mAb h409A11 y h409A16 conservaron completamente la afinidad del anticuerpo parental de ratón hPD109A tras la humanización.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> N.V. Organon Carven, Gregory Van Eenennaam, Hans Dulos, Gradus Johannes

20 <120> ANTICUERPOS CONTRA HPD-1

<130> OR06827

<150> 60/944583

25 <151> 18-06-2007

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

30

<210> 1

<211> 435

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Región variable de cadena pesada hPD-1.08A

<400> 1

40

```

atgrgatgga gctgtatcat kctctttttg gttagcaacag ctacaggtgt ccactcccag      60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagttgtcc -    120
tgcaaggcct ctggctacac cttcaccagt tattatctgt actggatgaa acagaggcct      180
ggacaaggcc ttgagtggat tggggggggt aatcctagta atgggtggtac taacttcagt      240
gagaagttca agagcaaggc cacactgact gttagacaaat cctccagcac agcctacatg      300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag aagggattct      360
aactacgacg ggggctttga ctactggggc caaggcacta ctctcacagt ctccctcagcc      420
aaaacgacac cccca

```

<210> 2

<211> 453

45 <212> ADN

ES 2 616 355 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de cadena ligera hPD-1.08A

5

<400> 2

```

atggagacag acacaactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacattgtgc tgacacagtc tctacttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc      120
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct ttagttattt gcaactggtae      180
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatcttcc ttgcatcaa cctagagtct      240

ggggtccttg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat      300
cctgtggagg aggaggacgc tgcaacctat tattgtcagc acagttggga gcttccgctc      360
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc      420
atcttcccac catccagtaa gcttgggaag ggc                                     453
    
```

10

<210> 3

<211> 464

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Región variable de cadena pesada hPD-1.09A

<400> 3

```

atgraatgca gotggggttat yctctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag      60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagttgtcc      120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccaac tactatatgt actgggtgaa gcagaggcct      180
ggacaaggcc ttgagtggat tggggggatt aatcctagca atggtggtac taacttcaat      240
gagaagttca agaacaaggc cacactgact gtagacagtt cctccagcac aacctacatg      300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct ggggtctatt actgtacaag aagggattat      360
aggttcgaca tgggctttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc      420
aaaacgacac ccccatccgt ytatcccbtg gcccctggaa gctt                                     464
    
```

20

<210> 4

<211> 438

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Región variable de cadena ligera hPD-1.09A

<400> 4

30

ES 2 616 355 T3

atggagwcag acacactset gytatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggc 60
gacattgtgc tgacacagtc tcttgcttcc ttagctgtat ctctgggaca gagggccgcc 120
atctcatgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcaactggtac 180
caacagaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc ttgcataccta cctagaatct 240
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 300
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga ccttccgctc 360
acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420
atcttccac catccagt 438

<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Región variable de cadena pesada hPD-1.08A

10

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Leu Tyr Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Ser Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys
115 120

<210> 6
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Región variable de cadena ligera hPD-1.08^a

20

ES 2 616 355 T3

<400> 6

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Phe Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

5

<210> 7
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada hPD-1.09A

15

<400> 7

ES 2 616 355 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ser Ser Ser Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys
 115 120

<210> 8

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Región variable de cadena ligera hPD-1.09^a

<400> 8

ES 2 616 355 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Ala Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

5 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera hPD-1.08A
 <400> 9

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Leu His
 1 5 10 15

15 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera hPD-1.08A
 <400> 10

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

30 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> CDR3 de cadena ligera hPD-1.08A
 <400> 11

ES 2 616 355 T3

Gln His Ser Trp Glu Leu Pro Leu Thr
 1 5

5 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada hPD-1.08^a
 <400> 12

Ser Tyr Tyr Leu Tyr
 1 5

15 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada hPD-1.08A
 <400> 13

25 Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Ser Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ser

30 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada hPD-1.08A
 <400> 14

Arg Asp Ser Asn Tyr Asp Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

40 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera hPD-1.09A
 <400> 15

50 Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT

ES 2 616 355 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2 de cadena ligera hPD-1.09A

5 <400> 16

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
1 5

10 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR3 de cadena ligera hPD-1.09A

<400> 17

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
1 . 5

20 <210> 18
<211> 5
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR1 de cadena pesada hPD-1.09A

30 <400> 18

Asn Tyr Tyr Met Tyr
1 5

35 <210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR2 de cadena pesada hPD-1.09A

40 <400> 19

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asn

45 <210> 20
<211> 11
<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR3 de cadena pesada hPD-1.09A

55 <400> 20

ES 2 616 355 T3

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 21
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable de cadena pesada 109A-H

10 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

15 <400> 21

atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcac caacaggagc ccactcccaa 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg agtgaagtg aagaagcccg ggcctcagt gaaggctctc 120
 tgcaaggctt ctggctacac cttaccaac tactatatgt actgggtgcg acaggcccct 180
 ggacaagggc ttgagtggat gggagggatt aatcctagca atggtggtac taacttcaat 240
 gagaagttca agaacagagt caccttgacc acagactcat ccacgaccac agcctacatg 300
 gaactgaaga gcctgcaatt tgacgacacg gccgtttatt actgtgcgag aagggattat 360
 aggttcgaca tgggcttga ctactggggc caagggacca cggtcacctg ctcgagc 417

20 <210> 22
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada 109A-H optimizada con codón

25 <220>
 <221> six_peptide
 <222> (1)..(57)

30 <400> 22

atggactgga cctgggtctat cctgttcttg gtggccgctc ctaccggcgc tcaactcccag 60
 gtgcagctgg tgcagtcagg cgtggaggtg aagaagcctg gcgcctccgt caaggtgtcc 120
 tgcaaggcct ccggtacac cttaccaac tactacatgt actgggtgcg gcaggctccc 180
 ggccagggac tggagtggat gggcggcacc aacccttcca acggcggcac caacttcaac 240
 gagaagttca agaaccgggt gaccctgacc accgactcct ccaccaccac cgcctacatg 300
 gagctgaagt ccctgcagtt cgacgacacc gccgtgtact actgcccag gcgggactac 360
 cggttcgaca tgggcttga ctactggggc cagggcacca ccgtgacctg gtcctcc 417

35 <210> 23
 <211> 1398
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 616 355 T3

<220>
 <223> Longitud completa de cadena pesada 409A-H optimizada de codón

5 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

<400> 23

```

atggcctgct tgggcctgct gttctgctg gtgaccttcc cttcctgcgt gctgtcccag      60
gtgcagctgg tgcagtccgg cgtggagggtg aagaagcctg gcgcctccgt caaggtgtcc      120
tgtaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactacatgt actgggtgcg gcaggcccca      180
ggccagggac tggagtggat gggcggcatc aacccttcca acggcggcac caacttcaac      240
gagaagttca agaaccgggt gaccctgacc accgactcct ccaccacaac cgctacatg      300
gaactgaagt ccctgcagtt cgacgacacc gccgtgtaact actgcgccag gcgggactac      360
cggttcgaca tgggcttcca ctactggggc cagggcacca ccgtgaccgt gtccctccgt      420
agcaccaagg gcccttccgt gttccctctg gcccttggct cccggccac ctccgagtcc      480
accgccgctc tgggctgtct ggtgaaggac tacttccctg agcctgtgac cgtgagctgg      540
aactctggcg ccctgacctc cggcgtgcac accttccctg ccgtgctgca gtccctccggc      600
    
```

10

```

ctgtactccc tgtcctccgt ggtgaccgtg ctttccctcc ccctgggcac caagacctac      660
acctgcaacg tggaccacaa gccttccaac accaagggtgg acaagcgggt ggagtccaag      720
tacggccctc cttgccctcc ctgccctgcc cctgagttcc tgggcggacc ctccgtgttc      780
ctgttccctc ctaagcctaa ggacaccctg atgatctccc ggaccctga ggtgacctgc      840
gtggtggtgg acgtgtccca ggaagatcct gaggtccagt tcaattggta cgtggatggc      900
gtggaggtgc acaacgcca gaccaagcct cgggaggaac agttcaactc cacctaccgg      960
gtggtgtctg tgetgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc      1020
aaggtcagca acaagggcct gccctcctcc atcgagaaa ccatctcca ggccaagggc      1080
cagcctcgcg agcctcaggt gtacaccctg cctcctagcc aggaagagat gaccaagaat      1140
caggtgtccc tgacatgcct ggtgaagggc ttctaccctt ccgatatcgc cgtggagtgg      1200
gagagcaacg gccagccaga gaacaactac aagaccacco ctctgtgct ggactccgac      1260
ggctccttct tctgtactc caggctgacc gtggacaagt cccggtggca ggaaggcaac      1320
gtcttttct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccctg      1380
tcctgtctc tgggcaag                                     1398
    
```

15 <210> 24
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera K09A-L-11

ES 2 616 355 T3

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(60)

5 <400> 24

```

atggaagccc cagctcagct tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccaccgga      60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      120
ctctcctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcactggtat      180
caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctatc ttgcatccta cctagaatct      240
ggcgtcccag ccaggttcag tggtagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc      300
agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc acagcagggga ccttccgctc      360
acgttcggcg gagggaccaa agtggagatc aaa                                     393
  
```

10 <210> 25
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera K09A-L-16

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(60)

20 <400> 25

```

atggaaaacc cagcgcagct totcttctct ctgctactct ggctcccaga taccaccgga      60
gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc      120
atctcctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcattggtac      180
ctccagaagc cagggcagtc tccacagctc ctgatctatc ttgcatccta cctagaatct      240
ggggtccctg acaggttcag tggcagtgga tcaggcacag attttact gaaaatcagc      300
agagtggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgccagc atagtaggga ccttccgctc      360
acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa                                     393
  
```

25 <210> 26
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera K09A-L-17

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(60)

35 <400> 26

ES 2 616 355 T3

```

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctgg atccagtggg      60
gatattgtga tgaccagac tccactctcc ctgccctca cccctggaga gccggcctcc      120
atctctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagtatttt gcattggtat      180
ctgcagaagc cagggcagtc tccacagctc ctgatctatc ttgcataccta cctagaatct      240
ggagtcccag acaggttcag tggcagtggg tcaggcactg ctttcacact gaaaatcagc      300
aggggtggagg ctgaggatgt tggactttat tactgccagc atagttagga ccttccgctc      360
acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa                                  393

```

5 <210> 27
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera K09A-L-11 optimizada de codón
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

15 <400> 27

```

atggeccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgcctgccat gcggtgagag      60
atcgtgctga cccagtcctc tgccaccctg tccctgagcc ctggcgagcg ggctaccctg      120
agctgcagag cctccaaggg cgtgtccacc tccggctact cctacctgca ctggtatcag      180
cagaagccag gccaggcccc tcggctgctg atctacctgg cctcctacct ggagtccggc      240
gtgcctgccc ggttctccgg ctccggaagc ggcaccgact tcaccctgac catctcctcc      300
ctggagcctg aggacttcgc cgtgtactac tgccagcact cccgggacct gcctctgacc      360
tttgccggcg gaacaaaggt ggagatcaag                                  390

```

20 <210> 28
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera K09A-L-16 optimizada de codón
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

30 <400> 28

ES 2 616 355 T3

```

atggcccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgcctgccat gcggtgagag      60
atcgtgctga cccagtcccc tctgtccctg cctgtgacct ctggcgagcc tgcctccatc      120
tcctgccggg cctccaaggg cgtgtccacc tccggctact cctacctgca ctggtatctg      180
cagaagcctg gccagtcccc ccagctgctg atctacctgg cctcctacct ggagtccggc      240
gtgcctgacc ggttctccgg ctccggcagc ggcaccgact tcaccctgaa gatctccggg      300
gtggaggccg aggacgtggg cgtgtactac tgccagcaact cccgggacct gcctctgacc      360
ttcggccagg gcaccaagct ggagatcaag      390

```

5 <210> 29
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera K09A-L-17 optimizada de codón

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(57)

15 <400> 29

```

atggcccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgcctgccat gcggtgagac      60
atcgtgatga cccagacccc tctgtccctg cctgtgacct ctggcgagcc tgcctccatc      120
tcctgccggg cctccaaggg cgtgtccacc tccggctact cctacctgca ctggtatctg      180
cagaagcctg gccagtcccc tcagctgctg atctacctgg cctcctacct ggagtccggc      240
gtgcctgacc ggttctccgg ctccggaagc ggcaccgctt ttaccctgaa gatctccaga      300
gtggaggccg aggacgtggg cctgtactac tgccagcaact cccgggacct gcctctgacc      360
ttcggccagg gcaccaagct ggagatcaag      390

```

20 <210> 30
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada 109A-H

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(19)

30 <400> 30

ES 2 616 355 T3

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Pro Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

- 5 <210> 31
- <211> 466
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Longitud completa de cadena pesada 409A-H
- <220>
- <221> sig_peptide
- <222> (1)..(19)
- 15 <400> 31

ES 2 616 355 T3

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

ES 2 616 355 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 225 230 235 240

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 275 280 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

ES 2 616 355 T3

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 32
<211> 130
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región variable de cadena ligera K09A-L-11

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(19)

<400> 32

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

ES 2 616 355 T3

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
 115 120 125

Ile Lys
 130

5 <210> 33
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera K09A-L-16

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(19)

15 <400> 33

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
 1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
 65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

Ile Lys
 130

ES 2 616 355 T3

<210> 34
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera K09A-L-17
 <220>
 10 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(19)
 <400> 34

 Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
 1 5 10 15

 Met Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
 35 40 45

 Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

 Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
 65 70 75 80

 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu
 85 90 95

 Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

 His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

 Ile Lys
 130
 15

 <210> 35
 <211> 469
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Longitud completa de cadena pesada 109A-H

 <220>
 <221> six-peptide
 <222> (1)..(19)
 25

 <400> 35
 30

ES 2 616 355 T3

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

ES 2 616 355 T3

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

ES 2 616 355 T3

450

455

460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

5 <210> 36
<211> 237
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Longitud completa de cadena ligera K09A-L-11

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(19)

15 <400> 36

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
115 120 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
130 135 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145 150 155 160

ES 2 616 355 T3

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 165 170 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
 195 200 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 210 215 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

- 5 <210> 37
- <211> 237
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Longitud completa de cadena ligera K09A-L-16
- <220>
- <221> sig_peptide
- <222> (1)..(19)
- 15 <400> 37

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
 1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
 65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln

ES 2 616 355 T3

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu
85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
130 135 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
165 170 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
195 200 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
210 215 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo aislados que se unen a PD-1 humano, que comprenden:
 - 5 CDR 1-3 de cadena ligera de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11 respectivamente y CDR 1-3 de cadena pesada de las SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente; en donde dichos anticuerpo o fragmento de anticuerpo bloquean la unión de PD-L1 humano y PD-L2 humano a PD-1 humano.
- 10 2. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dichos anticuerpo o fragmento de anticuerpo bloquean la unión de PD-L1 humano y/o PD-L2 humano a PD-1 humano con una CI_{50} de aproximadamente 1 nM o menor.
- 15 3. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, que comprenden:
 - a. una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 5 o una variante de la misma, en donde dicha variante comprende uno, dos o tres aminoácidos modificados de forma conservativa; y
 - b. una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6 o una variante de la misma, en donde dicha variante comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos modificados de forma conservativa;
- 20 4. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, que comprenden:
 - a. una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 5; y
 - b. una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6.
- 25 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada que comprende una región constante de cadena pesada humana $\gamma 4$ o $\gamma 1$.
- 30 6. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo son:
 - a. un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo;
 - b. un anticuerpo humano o un fragmento del mismo; o
 - c. un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.
- 35 7. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el fragmento de anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ y un diacuerpo.
- 40 8. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo aumentan la activación de los linfocitos T.
9. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 45 10. El polinucleótido aislado de la reivindicación 9, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 5 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6.
11. El polinucleótido aislado de la reivindicación 10, que comprende la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.
- 50 12. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.
13. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 12.
- 55 14. Un método de producción de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende:
 - a. cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 13 en medio de cultivo en condiciones en las que se expresa la secuencia de ácidos nucleicos, produciendo de este modo polipéptidos que comprenden las regiones variables de cadenas ligera y pesada; y
 - b. recuperar los polipéptidos de la célula hospedadora o del medio de cultivo.
- 60 15. Una composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en combinación con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 65 16. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o que se puede obtener mediante el método de la reivindicación 14 para su uso en el tratamiento del cáncer o de una infección o de

una enfermedad infecciosa.

17. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el uso es para el tratamiento del cáncer.

5

Figura 1

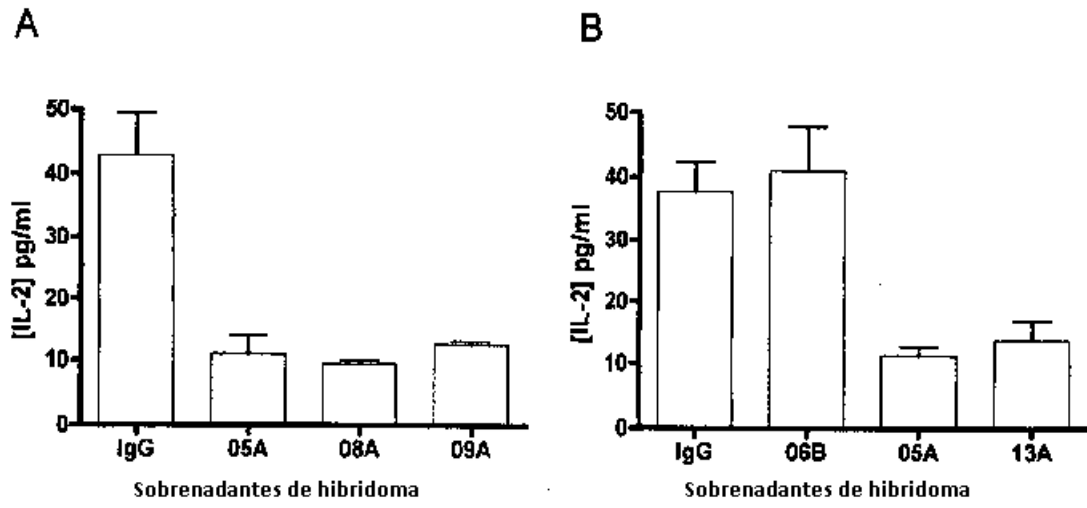
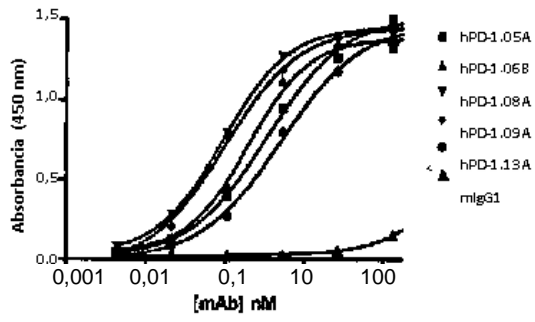


Figura 2

A Unión de Anticuerpo anti-PD-1 murino a hPD-1/Fc por medio de ELISA



B Unión de Anticuerpo anti-PD-1 murino a PD-1 humano expresado sobre células CHO

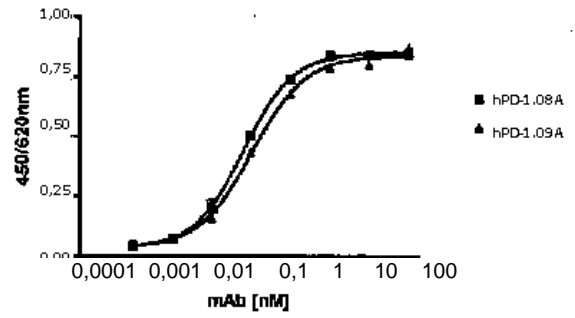


Figura 3

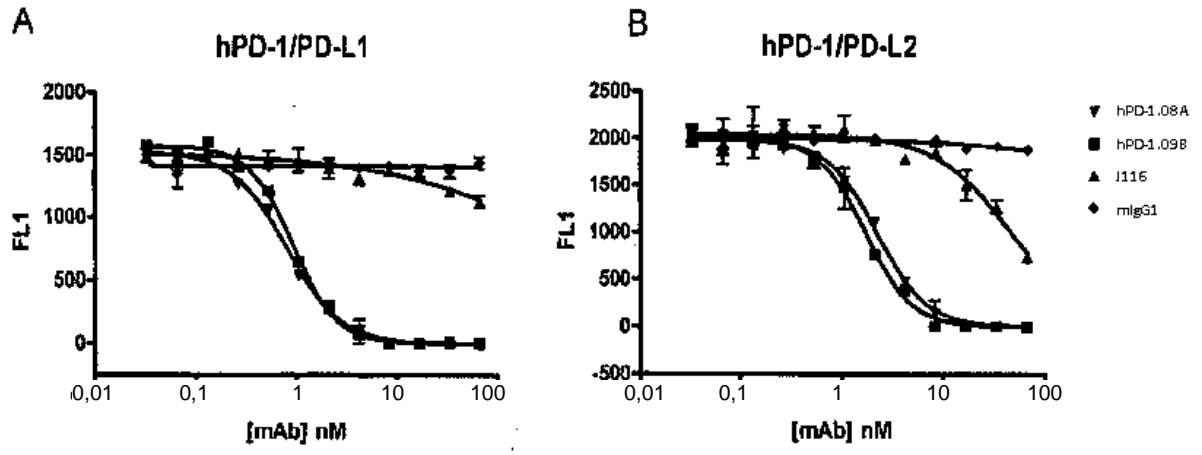


Figura 4

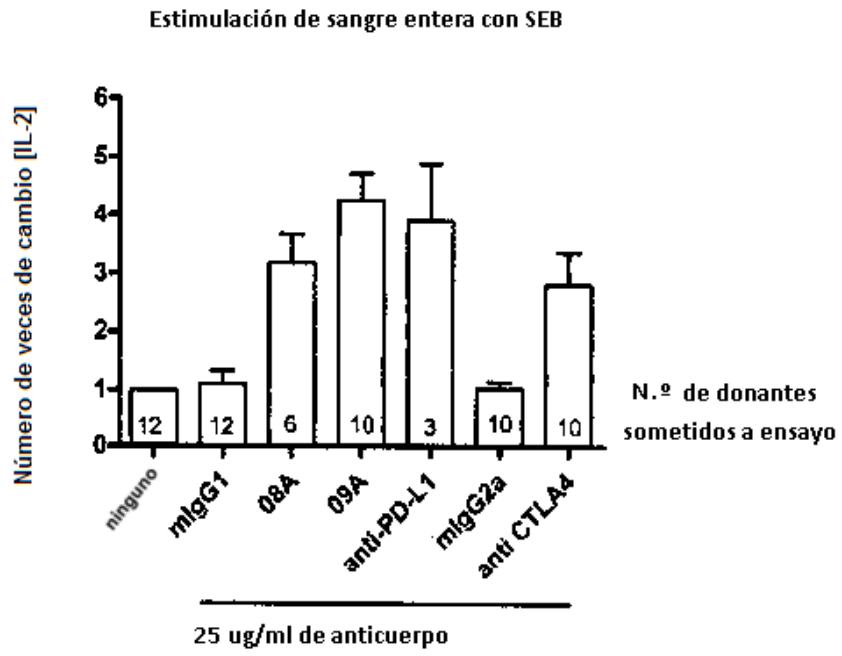


Figura 5

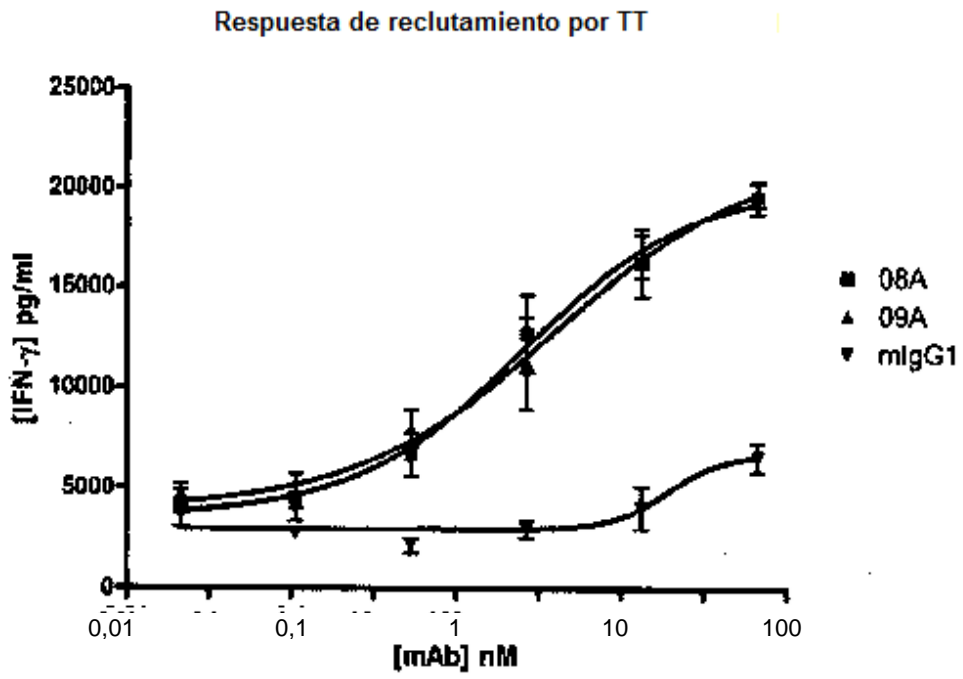


Figura 6

Análisis cinético de mAb anti-PD-1

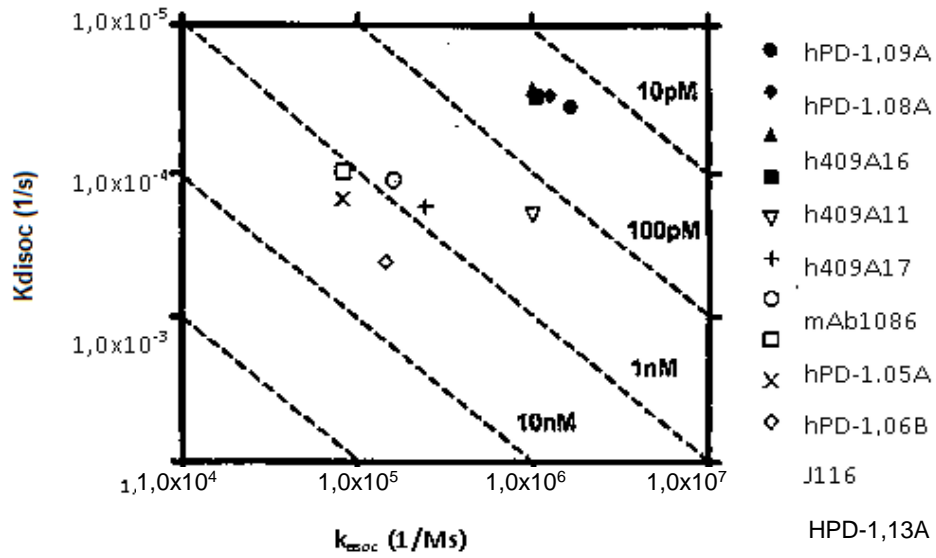


Figura 7

